



UNIVERSITÀ DI PISA

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN PATOLOGIA CLINICA

ANNO ACCADEMICO 2014/2015.

**"IL LABORATORIO DI ANALISI NELLA DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLE
PATOLOGIE AUTOIMMUNI"**

Relatore

Prof Alfonso Pompella

Candidato

Lucia Zagaria

Capitolo 1

Introduzione

Autoimmunità e malattie autoimmuni:

Il sistema immunitario presenta un elevatissimo numero di diverse specificità espresse dalle popolazioni linfocitarie B e T, alcune di queste sono rivolte verso antigeni costitutivamente espressi dall'organismo. In questo modo si creano meccanismi di auto-tolleranza che consentono di distinguere gli antigeni propri *self* dell'organismo, da quelli estranei (*non self*) allo scopo di evitare reazioni di autoreattività. L'autoimmunità è definita come un disordine del sistema immunitario che non riconosce più le proprie strutture cellulari e tissutali e produce anticorpi diretti contro di esse, l'attivazione del sistema immunitario può essere di tipo umorale e/o di tipo cellulare in grado di alterare l'integrità e la funzione delle cellule e degli organi bersaglio. Le malattie autoimmuni presentano un'incidenza e una prevalenza non particolarmente elevate, infatti ad eccezione dell'artrite reumatoide che colpisce circa il 2% degli individui adulti altre patologie colpiscono nel complesso non più del 1,5% della popolazione, le malattie autoimmuni sono classificabili in due gruppi generali: malattie organo specifiche, caratterizzate dalla produzione di anticorpi contro antigeni appartenenti ad un organo specifico, e malattie non organo specifiche caratterizzate dalla presenza di anticorpi contro antigeni diffusi in tutto l'organismo, e in particolare contro componenti del tessuto connettivo, quindi cute, vasi sanguigni reni, e articolazioni. Gli autoanticorpi sierici possono essere presenti anche in soggetti sani specie nei pazienti anziani, autoanticorpi innocui possono formarsi anche in seguito a lesioni tissutali e possono avere un ruolo fisiologico nella rimozione dei detriti cellulari (1) la diagnosi di malattia autoimmune richiede tre condizioni:

- 1) La reazione immunitaria deve essere specifica per un dato antigene *self* o tessuto autologo
- 2) La reazione non deve essere secondaria ad una lesione tissutale ma deve essere la causa primaria della malattia.
- 3) Assenza di altre cause note di malattia.

Spesso queste malattie sono classificate come malattie infiammatorie immuno-mediate per sottolineare il ruolo patogenetico della flogosi cronica, Il quadro clinico delle malattie autoimmunitarie è estremamente vario per tanto la diagnosi si avvale anche di test di laboratorio di primo e di secondo livello che grazie all'elevato valore predittivo positivo e negativo contribuiscono alla diagnosi e al monitoraggio delle patologie autoimmuni. (1)

Criteri maggiori di diagnosi di malattia autoimmune:

Affinché una malattia possa essere definita autoimmune deve soddisfare i seguenti criteri:

1. Presenza di autoanticorpi a livello di un organo bersaglio o circolanti.
2. Presenza di infiltrati linfocitari autoreattivi in un organo bersaglio (patologia autoimmune organo specifica), oppure diffusi in diversi apparati (patologia autoimmune non organo specifica).
3. Identificazione e isolamento di autoantigeni impegnati nella reazione autoimmune.
4. Efficacia della terapia immunosoppressiva (plasmaferesi o trattamento intravenoso con immunoglobuline).
5. Possibilità di riprodurre la patologia in animali da esperimento mediante inoculo di siero,

autoanticorpi purificati o di linfociti specifici.

6. Possibilità di indurre malattia in animali somministrando l'antigene

1.1 Criteri di diagnosi:

.COMUNI

familiarità

associazione con HLA

Sesso femminile

decorso clinico caratterizzato da esacerbazioni e remissioni con associazione ad altre malattie autoimmuni

. SPECIFICI

Delle malattie organo-specifiche:

gli autoantigeni sono a bassa concentrazione

gli anticorpi sono organo specifici

le lesioni vengono indotte prevalentemente da immunoreazioni di tipo II, IV, V, VI.

Delle malattie non organo specifiche:

gli autoantigeni sono in alta concentrazione

gli autoanticorpi non sono organo-specifici

le lesioni vengono indotte prevalentemente da immunoreazioni di tipo III, e IV. (2)

1.2 Classificazione delle malattie Autoimmuni :

Le malattie autoimmuni vengono classificate in tre gruppi principali

1) *Malattie autoimmuni organo-specifiche* : caratterizzate da risposte autoimmunitarie umorali e/o cellulari mediate rivolte verso antigeni di singoli organi con alterazioni organiche e funzionali.

Le lesioni possono essere indotte da immunoreazioni di tipo II, IV, V, VI che promuovono la distruzione cellulare da iperfunzione (Tiroditte di Hashimoto) o ipofunzione (morbo di Graves-Basedow)

2) *Malattie autoimmuni intermedie*: caratterizzate da infiltrati linfocitari limitati ad un singolo organo o apparato, e da risposte umorali e/o cellulari contro autoantigeni non organo-specifici (antigeni nucleari, mitocondriali, gammaglobuline) le immunoreazioni sono mediate da meccanismi di tipo II, III, o IV.

Il prototipo di questo tipo di malattie è la cirrosi biliare primitiva

3) *Malattie autoimmuni non organo-specifiche o sistemiche*: sono caratterizzate dall'interessamento sistemico dell'organismo come conseguenza di una reazione autoimmune diretta contro antigeni

ubiquitari.

Le alterazioni sono indotte da immunoreazioni di tipo III con formazione di immunocomplessi in grado di depositarsi a livello della parete dei vasi con secondaria attivazione del complemento e flogosi generalizzata, il LES rappresenta la malattia prototipo. (2)

Capitolo 2

2.1 EZIOPATOGENESI DELLE MALATTIE AUTOIMMUNI:

I dati desunti da studi sulle malattie autoimmuni umane depongono per una base predisponente genetica multifattoriale con l'unica eccezione della sindrome APECED o sindrome plurighiandolare autoimmune di tipo I, dovuta a mutazione del gene AIRE con eredità monogenica autosomica recessiva, il gene AIRE svolge un ruolo essenziale nella selezione negativa delle cellule T autoreattive.

L'identificazione dei geni coinvolti nelle MAIS è complessa come risulta dai numerosi studi effettuati attraverso lo screening genomico o lo studio di singoli geni candidati.

L'attenzione si è rivolta da tempo ovviamente alla regione codificante per gli antigeni del sistema HLA

Tuttavia nonostante molti dati depongano a favore di un ruolo predisponente dell'aplotipo HLA le malattie autoimmuni non hanno una base esclusivamente genetica, ci sono diversi fattori che predispongono allo sviluppo di queste malattie, come i fattori ormonali, fattori ambientali.

2.2 Fattori neuroendocrini

il sesso femminile è più colpito rispetto al sesso maschile anche nei modelli animali, questa differenza si potrebbe attribuire sia alla presenza di geni sui cromosomi sessuali sia perché gli ormoni maschili interferiscono con le risposte immunitarie indipendentemente dall'assetto genetico.

Lo stress sembra avere un ruolo nello sviluppo delle malattie autoimmuni

L'asse ipotalamo-ipofisi corticosurrene è legato da interrelazioni con la produzione di citochine proinfiammatorie, IL1 TNF alfa e IL6 stimolano la produzione di relasing factor ipotalamici che inducono la produzione ipofisaria di ACTH con conseguente produzione di cortisolo il quale ha una potente azione antinfiammatoria ed un'azione inibente l'immunità cellulo-mediata, con la riduzione di citochine proinfiammatorie sia di origine linfocitaria che monocitico macrofagica, risulta invece incrementata la produzione di citochine ad azione infiammatoria come il TGF beta e IL10, oltre a IL4, IL5, IL13, tale azione dipende dalla concentrazione in quanto a concentrazione basse l'effetto è promuovente la risposta immune.

Un altro effetto immunomodulante dovuto allo stress riguarda le catecolammine, il loro effetto sul sistema immunitario è molto complesso, i recettori beta adrenergici sono presenti sulle cellule immunocompetenti e citochine proinfiammatorie possono causare un up regolazione dei recettori alfa 1 adrenergici.

In alcuni pazienti con artrite reumatoide è stato documentato un aumento del tono adrenergico e a livello sinoviale la perdita di recettori beta adrenergici.

Sono state trovate delle alterazioni a livello dei recettori intracellulari per i glicocorticoidi nella artride reumatoide che suggeriscono una resistenza periferica all'azione dell'ormone .

Gli estrogeni hanno un effetto immunostimolante per quanto riguarda l'immunità umorale, e proliferante sulle cellule, mentre il progesterone e gli androgeni sembrano avere un comportamento immunosoppressivo e promotori dell'apoptosi.

DHEA, DHEAS ,DHT dawnow regolano la produzione di IL6 e il DEAS in vitro si è visto che modula la produzione di citochine da parte dei linfociti T con aumento delle citochine che promuovono una risposta T helper 1

nella donna dopo il 45 anni di età le prevalenze delle malattie autoimmuni sembrano uguagliare quella degli uomini, inoltre un aumento degli estrogeni si è osservato nei maschi malati di artride reumatoide.

Anche la gravidanza alterando l'assetto ormonale influenza il decorso clinico delle malattie autoimmuni come la AR ed il LES, si osserva un miglioramento nella prima, e una recrudescenza nella seconda, queste differenze sono dovute probabilmente ai meccanismi immunopatologici implicati, in gravidanza aumentano le citochine prodotte dai linfociti T helper 2.

L'aumento della prolattina sembra precedere l'insorgenza di una MAIS, ma il meccanismo non è stato ancora chiarito.

2.3 Fattori ambientali:

I fattori ambientali comprendono anche microrganismi , sostanze chimiche come farmaci, alimenti, e additivi chimici.

Microrganismi come il virus Epstein Bar Herpes, Citomegalovirus , mediante diversi meccanismi come l'attivazione policlonale, mimetismo antigenico e infiammazione possano avere un ruolo favorente lo sviluppo di malattie autoimmuni, si è discusso anche sul ruolo delle vaccinazioni come quella per l'epatite B , ma ancora sono da dimostrare.

2.4 Fattori genetici:

La regione del genoma umano più studiata per quanto riguarda l'eziopatogenesi delle malattie autoimmuni è quella situata sul braccio corto del cromosoma 6 (6p 21.3) dove si trova l' HLA (human Leucocyte Antigen). Che codifica per numerose glicoproteine polimorfe immunoregatorie, viene definito complesso maggiore di istocompatibilità , in quanto responsabile del rigetto dei trapianti, e delle reazioni trasfusionali, gli HLA di classe I sono presenti su tutte le cellule nucleate, e gli HLA di classe II presenti sui leucociti, ed è coinvolto nella presentazione dei peptidi antigenici alle cellule effettrici, l'HLA di classe III codifica per le proteine del complemento e del TNF.

al quale sono associati, a livello strutturale un'altra caratteristica è la facilità di associazione con altri alleli (Linkege Disequilibrium) che determinano la costituzione di aplotipi, dove possono essere presenti geni coinvolti in molte malattie autoimmuni. (3)

2.5 Tolleranza immunologica :

La tolleranza immunologica è una condizione di particolare di non responsività specifica per un

dato antigene, essa viene indotta in seguito ad una precedente esposizione allo stesso antigene.

I meccanismi attivi della tolleranza sono necessari al fine di prevenire le risposte infiammatorie dirette verso antigeni innocui di origine alimentari o presenti nell'aria che vengono in contatto con le mucose dell'intestino e del polmone.

La principale caratteristica di questo fenomeno è la tolleranza verso gli antigeni *self* per evitare l'attacco del sistema immunitario contro i costituenti del proprio organismo.

La possibilità di reagire verso gli antigeni *self* deriva dal fatto che il sistema immunitario genera in maniera casuale un'ampia varietà di recettori specifici per l'antigene, alcuni dei quali possono risultare autoreattivi.

Le cellule che esprimono tali recettori devono pertanto essere eliminate fisicamente o bloccate funzionalmente

La possibilità di distinguere il *self* dal *non self* è un processo acquisito che si svolge durante l'ontogenesi, il *self* immunologico comprende tutti gli epitopi codificati dal DNA dell'individuo mentre tutti gli altri epitopi sono considerati *non self*, studi su animali omozigoti di ceppi istocompatibili A e B rigettano i trapianti cutanei l'uno dell'altro, e la loro prole ibrida F1 non rigetta né i trapianti di A né quelli di B, mentre nella progenie omozigote F2 ricompare la possibilità del rigetto del trapianto.

2.6 Cenni storici

Dopo la scoperta della specificità degli anticorpi ci si domandava quali meccanismi ostacolavano la produzione di autoanticorpi, alcuni esperimenti misero in evidenza che ciò avviene durante lo sviluppo ontogenico.

Nel 1938 Traub indusse una tolleranza specifica verso il virus della coriomeningite linfocitaria LCMV, inoculando topi durante la loro vita intrauterina i quali da adulti in seguito ad altre inoculazioni di tale virus non sviluppavano anticorpi neutralizzanti, mentre topi adulti inoculati con il virus LCMV li producevano.

Nel 1945 Owen eseguì un esperimento su due vitelli gemelli non identici con la placenta in comune, questi animali si scambiavano cellule staminali ematiche attraverso i vasi placentari, e ciascun gemello presentava anche i marcatori eritrocitari dell'altro.

In seguito a queste osservazioni Burnet e Fenner ipotizzarono che l'età in cui l'animale viene in contatto con l'antigene è fondamentale, infatti il sistema immunitario viene a contatto con gli antigeni *self* prima della nascita e con quelli *non self* dopo la nascita.

Ma è nel 1953 grazie a Medawar e collaboratori che indussero in alcuni topi una tolleranza immunologica per trapianti allogenici di cute mediante inoculazione di cellule allogeniche durante l'età neonatale, tale esperimento fu facilmente adattato alla teoria della selezione clonale di Burnet nel 1957, che stabilisce che una particolare cellula immunocompetente viene selezionata dall'antigene e quindi indotta a proliferare e dare origine ad un clone di cellule figlie tutte dotate della stessa specificità.

Secondo questa teoria, gli antigeni incontrati dopo la nascita attivano specifici cloni di linfociti, mentre quelli incontrati prima della nascita li provocano una eliminazione di tali cloni.

Nel 1959 Ledeberg modificò la teoria della selezione clonale affermando che i linfociti immaturi che incontrano l'antigene dovrebbero essere soggetti ad un aborto clonale, mentre le cellule mature dovrebbero essere stimulate.

Le scoperte degli anni 60 hanno messo in evidenza il ruolo fondamentale del timo nello sviluppo del sistema immunitario e l'esistenza di due sottopopolazioni interagenti di linfociti B e T .

2.7 Induzione sperimentale della tolleranza:

Le tecniche transgeniche hanno consentito lo studio della tolleranza verso antigeni *self* autentici , la possibilità di lavorare con animali transgenici ha reso possibile uno studio diretto della tolleranza per il *self* , introducendo un gene specifico nel genoma in un topo di un ceppo ben definito e quindi le analisi degli effetti provocati sullo sviluppo del sistema immunitario.

La proteina transgene è riconosciuta dal sistema immunitario come un vero antigene *self* ed è possibile studiarne gli effetti in vivo.

Anche l'uso di *knock out* di geni specifici allo scopo di studiare il ruolo dei loro prodotti genici nel processo della tolleranza immunologica

Esistono cinque possibili meccanismi con cui vengono sopresse le risposte agli antigeni *self* mediate da linfociti autoreattivi

1) Le cellule T autoreattive circolanti possono ignorare gli antigeni *self* quando questi sono sequestrati in tessuti non in diretto contatto con la circolazione.

2) la loro risposta ad un antigene *self* può essere soppressa se l'antigene si trova in un sito privilegiato.

3) le cellule autoreattive possono essere distrutte durante alcune fasi dello sviluppo o rese anergiche e incapaci di rispondere.

) lo stato di tolleranza può essere mantenuto da una regolazione immunitaria.

Il meccanismo utilizzato dipende da diversi fattori come lo stato di maturazione della cellula che deve essere soppressa, l'affinità del suo recettore per

l'antigene, e la natura dell' autoantigene come la sua concentrazione e la sua distribuzione.

2.8 Tolleranza Centrale:

L'organizzazione strutturale del timo è coinvolta nel processo di selezione positiva e negativa delle cellule T.

Le cellule epiteliali della corticale presentano una ampia gamma di antigeni endogeni e contribuiscono alla selezione positiva.

Le APC della midollare hanno accesso agli antigeni circolanti e sono responsabili della selezione negativa.

La generazione dei nuovi recettori TRC comprende il riarrangiamento genico per consentire al sistema immunitario di generare un vasto repertorio di recettori delle cellule T .

Il ruolo delle cellule T è vario; non solo sono cellule effettrici del sistema immunitario ma svolgono anche ruoli di regolazione potenziando alcune risposte e sopprimendone altre e questo rappresenta uno dei motivi per cui si è evoluta la restrizione MHC del riconoscimento delle cellule T.

Questo processo di tolleranza centrale si sviluppa all'interno del timo e dipende dai numerosi checkpoint attraverso i quali devono passare le cellule per progredire il loro sviluppo.

Le sottopopolazioni dei linfociti T alfa beta, e gamma delta, derivano da una cellula progenitrice linfoide comune da cui hanno origine anche i linfociti B e cellule NK.

Quando le cellule immature T penetrano nel timo non esprimono né molecole co-recettoriali CD4 né le CD8 e vengono dette doppio-negative.

I diversi TCR sono generati dalla ricombinazione dei segmenti genici V D J ed avviene in questa fase che i geni della catena beta del TCR iniziano il processo di ricombinazione che comprende il riarrangiamento dei geni delle regioni D e J in seguito il segmento genico DJ riarrangia con un gene V della regione variabile.-

Il segmento VDJ si combina con una regione costante mediante lo splicing alternativo dell' RNA così da ottenere un gene completo che codifica per la regione beta, la catena beta dal reticolo endoplasmatico insieme alla catena alfa e CD3, migrano verso la superficie cellulare e l'inattivazione dei geni RAG determina la proliferazione delle cellule CD4 e CD8 positive.

Le cellule subiscono una educazione timica, una selezione positiva seguita da una selezione negativa e il ruolo svolto dall MHC espresso dalle APC del timo è determinate.

Le cellule che non sono capaci di legare le molecole di MHC di prima e seconda classe vanno incontro a morte programmata, e le cellule che legano l'MHC con troppa avidità vanno incontro allo stesso processo di morte.

Le cellule maturano da doppie positive a singole positive e l' MHC svolge un ruolo chiave ma tuttavia i segnali trasmessi attraverso le molecole CD4 e CD8 indirizzano la scelta della linea cellulare, ma anche l'intensità dei segnali trasmessi attraverso il TCR, si è visto infatti che potenziando i segnali si ottengono popolazioni prettamente CD4 positive.

Anche le chinasi lck associate alla molecola CD4 indirizzano verso la scelta della linea cellulare CD4 positiva.

Sono quattro i checkpoint nella tolleranza centrale delle cellule T e comprendono:

- 1) solo cellule in cui è avvenuto un riarrangiamento della catena beta possono passare da doppio-negativa a doppio-positiva, questo processo non dipende dal MHC.
- 2) Le cellule che esprimono un complesso alfa beta devono interagire con l' MHC per poter sopravvivere.
- 3) Le cellule vengono educate ad esprimere solo o CD4 o CD8 per svilupparsi in singole positive.
- 4) Le cellule che reagiscono con troppa avidità con le proteine MHC vengono eliminate (selezione negativa),

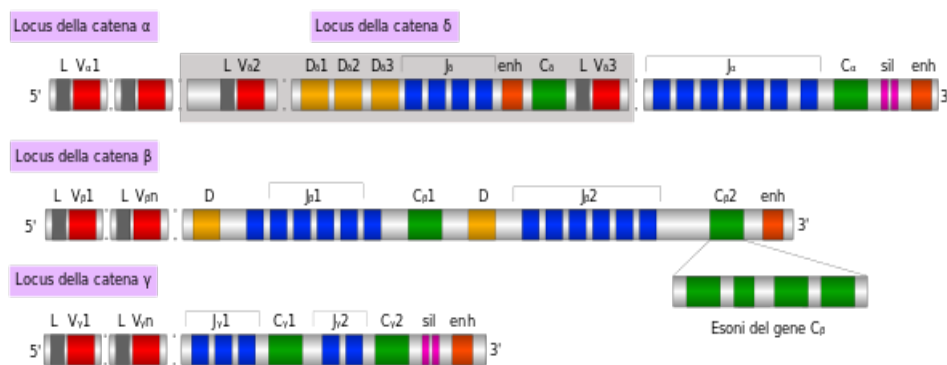


Fig 2.1 Riarrangiamento genico TCR.

2.9 TOLLERANZA PERIFERICA POST TIMICA :

Alcune cellule T autoreattive riescono comunque ad entrare in circolo e sfuggire ai meccanismi di tolleranza centrale, e a questo punto che entrano in gioco meccanismi complessi di tolleranza periferica, alcuni dei quali comprende l'incapacità di cellule autoreattive di raggiungere gli antigeni che si trovano i siti privilegiati : cervello, testicoli, e la camera anteriore dell'occhio, in questi siti i linfociti vengono tenuti sotto controllo sia dalla apoptosi che da citochine come il TGF-beta , che IL10.

2.10 L'Apoptosi come meccanismo di controllo per le cellule autoreattive:

Il ruolo svolto dalla apoptosi è di estrema importanza ed è essenziale per il mantenimento dell'omeostasi del sistema immunitario, i linfociti vengono distrutti quando risultano troppo reattivi o quando hanno finito il loro compito.

La loro distruzione avviene con due meccanismi : la morte cellulare indotta da attivazione mediante il recettore FAS / FASL e la morte cellulare passiva per la quale la cellula si priva di fattori di crescita in tali condizioni i mitocondri rispondono rilasciando il citocromo C e attivazione delle caspasi.

È stato dimostrato che mutazioni del gene ALPS che codificano per il FAS e il FASL (ALPS1b) e dei geni che codificano per IL2 ,IL-2R α e β determinano nell'uomo una sindrome linfoproliferativa autoimmune .

2.11 Molecole co-stimolatorie:

Per la proliferazione le cellule T mediante il TCR devono riconoscere il complesso Peptide-MCH ma anche le molecole co- stimolatorie come CD 80 CD 86 espresse dalle cellule APC,

Il CD28 è espresso costitutivamente in quasi tutte le cellule T CD4 positive e solo nell 50% delle CD8 positive e favorisce la sopravvivenza cellulare e inibisce l'anergia, potenziando l'espressione del CD40L si lega la CD 80 e CD 86 delle APC.

Il CTLA-4 Ha l'80% di omologia con il CD28 utilizza gli stessi ligandi con una affinità maggiore ed è un potente inibitorio delle cellule T, riduce il segnale per il CD28 e inibisce l'espressione della IL2 e IL2R , blocca le cellule T in fase G1.

Topi knockout per questa molecola sviluppano una malattia linfoproliferativa letale , con uno sviluppo della tolleranza centrale normale.

Le cellule dendritiche linfoidi a differenza delle cellule dendritiche mieloidi, hanno il compito di presentare gli antigeni endogeni ed il loro riconoscimento come *self* comporta la morte cellulare per apoptosi delle cellule reattive.

Un mancato controllo sull'omeostasi porta all'insorgenza di autoimmunità. (4)

2.12 i Linfociti T regolatori CD 25+ CD4+,CD45RB

Un animale è capace di rispondere allo stesso antigene seguendo due percorsi diversi, la capacità di provocare una risposta cellulare o umorale riflette l'attivazione dei due rami del sistema immunitario, che possono agire in maniera antagonista tra loro.

Esistono due popolazioni di linfociti T che producono citochine diverse le TH1 che producono il IFN- γ e il TGF- β e le cellule TH2 che producono (IL4,IL5,IL6,IL10) che favoriscono la sintesi di anticorpi. (5)

I linfociti TH2 con la produzione di IL 10 sono in grado di sopprimere la presentazione dell'antigene da parte dei macrofagi alle cellule TH1 e T naive , e quindi di sopprimere le risposte infiammatorie (ipersensibilità DTH) .(6)

Mentre le cellule TH1 mediante la produzione di (IFN)- γ sono capaci di ostacolare la differenziazione in linfociti TH2.

È stato possibile riprodurre malattie autoimmuni come il diabete insulino-dipendente , la tiroidite e la gastrite eliminando semplicemente i linfociti T CD4 che esprimono il CD 5 e il CD25 o una isoforma di CD 45.(7)

Queste cellule attivate producono citochine immunosoppressive come il TGF beta e IL10.

Tuttavia recentemente sono stati scoperti linfociti T regolatori caratterizzati da un fenotipo particolare

Le cellule che esprimono il CD25 sono potenti regolatori della risposta immunitaria ma non tutte , infatti l'espressione del CD25 nei linfociti T naive aumenta in seguito alla risposta con un antigene, a questo livello è il timo che ha un ruolo importante nella produzione di cellule T CD25 regolatrici infatti esperimenti dimostrano che una tiretomia in topi prima che le cellule T CD 25 abbiano popolato gli organi linfatici periferici porta all'insorgenza di malattie autoimmuni.(8)

Anche linfociti T CD8+ gamma delta sono in grado di sopprimere le risposte allergiche e di controllare il diabete nel topo. (9)

I linfociti T regolatori o Tregs svolgono un ruolo chiave nel mantenimento della tolleranza immunitaria, sia verso antigeni autologhi che verso antigeni alloigenici. I Tregs esercitano la propria azione soppressiva mediante contatto diretto cellula-cellula, oppure mediante la produzione di citochine con funzioni immunoregatorie, come IL-10 e TGF- β . Inizialmente è stata identificata nel topo una popolazione di cellule regolatorie CD4+ che esprimono costitutivamente la catena α del recettore dell'IL-2 (CD25) e che mostrano una forte attività soppressiva sia in vitro che in vivo . Questi Tregs murini sono anergici se stimolati in vitro con un anticorpo diretto contro il CD3, proliferano se stimolati con IL-2 esogena e sopprimono l'attivazione e la proliferazione di altri linfociti T tramite un meccanismo che richiede il contatto cellulare. Inoltre, esprimono in maniera costitutiva anche il CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen) un regolatore negativo

dell'attivazione T cellulare indispensabile per la soppressione della risposta in vivo . (10) Alla luce delle potenti capacità soppressive dei Tregs murini, si è cercato di verificare la presenza di una simile popolazione cellulare anche nell'uomo. I risultati ottenuti dimostrano che i Tregs sono presenti nel sangue periferico umano; rappresentano circa il 3% delle cellule totali presenti nel sangue e circa il 13% dei linfociti CD4+. La maggior parte di essi esprime, oltre alle molecole CD4 e CD25, anche i marker CD45RO, HLADR, CTLA-4 ed il fattore citoplasmatico Foxp3 (Forkhead box p3); l'espressione di quest'ultimo sui Tregs è accompagnata da una downregolazione del marker di superficie CD127 (recettore per IL-7) .(11) I Tregs mostrano, inoltre, una ridotta espressione del CD40L, una upregolazione del CTLA-4 in seguito a stimolazione mediata dal T cell receptor e producono citochine soltanto se attivati da APC allogeniche: le citochine prodotte sono rappresentate principalmente da IL-10, TGF- β e da bassi livelli di Interferon (IFN)- γ . Essi, inoltre, non mostrano proliferazione in risposta ad allo-antigeni.(11) Il fattore di trascrizione Foxp3 ha un ruolo importante nello sviluppo e nella funzionalità dei Tregs. Infatti, la presenza di mutazioni nel gene umano Foxp3 è causa di una malattia genetica chiamata IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome), caratterizzata da iperattivazione di cellule CD4+ e sovrapproduzione di citochine proinfiammatorie . (12) Inoltre, la trasduzione di Foxp3 in cellule T naive aumenta l'espressione di CD25 e di altre molecole di superficie, come CTLA-4 e GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor, una molecola di superficie coinvolta nell'inibizione del ruolo soppressorio dei Tregs); allo stesso tempo reprime la produzione di IFN- γ , di IL-4 (citochina che induce il differenziamento di linfociti T-helper naive) e di IL-2 . (13) In particolare, proprio tramite IL-2 è attivo un controllo a feedback della risposta immunitaria. L'IL-2, prodotta da cellule T attivate (non regolatorie), contribuisce al mantenimento, all'espansione ed all'attivazione di Tregs che, a loro volta, limitano l'espansione di cellule T prive di ruolo regolatorio. I meccanismi mediante i quali i Tregs sopprimono l'attività di cellule effettrici possono essere classificati secondo quattro modalità di azione : soppressione tramite citochine inibitorie; - citolisi; - "interruzione metabolica"; - modulazione di maturazione/funzionalità di DCs (14). Per quanto riguarda il primo meccanismo, le citochine maggiormente coinvolte sembrano essere IL-10 (citochina con ruolo anti-infiammatorio, in grado di sopprimere il rilascio di citochine proinfiammatorie e inibire la capacità di presentare gli antigeni nelle APCs) e TGF- β (una proteina che controlla l'espressione di Foxp3 ed il differenziamento di Tregs), soprattutto in fenomeni allergici o infettivi, ma anche in situazioni di carcinogenesi . (15) Recentemente l'IL-35 (citochina coinvolta nella soppressione della risposta infiammatoria) è stata descritta come espressa preferenzialmente dai Tregs e da essi richiesta per raggiungere un livello massimo di attività soppressoria. I Tregs possono inoltre limitare l'espansione di cellule T effettrici o APCs anche tramite l'impiego di granzimi o perforine. In particolare, il granzima A appartiene alla famiglia delle serin-proteasi principalmente presenti nei granuli citoplasmatici di linfociti e cellule NK.(16) Esso penetra nelle cellule bersaglio utilizzando pori creati dalle perforine, poi taglia ed attiva le caspasi intracellulari allo scopo di indurre apoptosi nella cellula target stessa . Uno studio recente suggerisce che i Tregs possono provocare citolisi anche mediante la via TRAIL-DR5 (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand-Death Receptor 5) (17). Inoltre, nei Tregs è stata dimostrata l'upregolazione di Galectina-1, una proteina normalmente coinvolta nell'induzione di apoptosi di cellule T (18). Un altro meccanismo di soppressione si basa sull'invio di segnali di "interruzione metabolica" alle cellule T responder; uno di questi segnali è l'upregolazione dell'AMP ciclico intracellulare il quale, trasferito nelle cellule bersaglio tramite gap junctions, inibisce la loro proliferazione e la produzione di IL-2. L'altro segnale negativo è la generazione di adenosina pericellulare catalizzata da CD39 (ectonucleoside trifosfato difosfoidrolasi 1) e CD73 (ecto-5'-nucleotidasi) espressi dai Tregs . Il legame dell'adenosina pericellulare con un particolare recettore determina l'inibizione della funzionalità di cellule T effettrici e stimola la produzione di Tregs tramite l'inibizione dell'espressione di IL-6 (citochina che ha ruolo nella produzione di cellule pro-

infiammatorie, quali linfociti Th17) e stimolo del rilascio di TGF- β . I Tregs attivati possono, inoltre, stimolare le DCs a produrre Indoleamina 2,3 diossigenasi (IDO). IDO è un enzima con funzione immunosoppressiva che catalizza la conversione dell'aminoacido essenziale triptofano in chinurenine (metaboliti tossici per le cellule T). Questa proprietà conferisce a IDO la capacità di inibire la risposta immunitaria sia causando la deplezione dal microambiente di triptofano, che è necessario ai linfociti T per proliferare ed espandersi, sia producendo metaboliti che possono causare l'apoptosi dei linfociti T. La rimozione del triptofano dall'ambiente cellulare porta all'arresto del ciclo cellulare con conseguente morte delle cellule effettrici. Inoltre, i prodotti di degradazione (tra cui la chinurenina stessa) possono inviare alle cellule adiacenti segnali anti-proliferativi. Questo enzima è in grado di ridurre l'espressione di CD80 e CD86 nelle APCs. Poiché queste due molecole costimolatorie interagiscono con il CD28 (recettore coinvolto nell'attivazione dei linfociti T), la diminuzione della loro espressione comporta un calo nella stimolazione delle cellule T-effettrici. In realtà, studi recenti suggeriscono che LAG3 (Lymphocyte Activation Gene 3, detto anche CD223) è coinvolto nel blocco della maturazione di DCs. LAG3 è un omologo del CD4 che lega le molecole MHC-II con grande affinità, possiede intrinsecamente una funzione regolatrice ed è richiesto per la massima attività soppressoria dei Tregs. Le cellule T-effettrici hanno un ruolo importante nel potenziamento dell'attività soppressoria dei Tregs: le interazioni ligando/recettore tra cellule effettrici CD4⁺ messe in cocoltura con Tregs danno inizio ad una cascata di eventi in cui l'IL-2 sembra avere un ruolo importante, in quanto induce il rilascio di IL-35 e potenzia l'attività regolatoria stessa. Infatti, lo studio dei profili genetici dei Tregs attivati, in presenza o assenza di cellule bersaglio, sembra suggerire che l'interazione tra le due popolazioni cellulari incrementi l'espressione di altre proteine regolatorie. Questa popolazione, quindi, è in grado di inibire la proliferazione e l'attivazione di altri linfociti T: grazie a tale proprietà i Tregs potrebbero rappresentare un possibile strumento prezioso in clinica, ad esempio, nella cura delle malattie autoimmuni e nella prevenzione del rigetto di trapianto. (18)

2.13 TOLLERANZA B DIPENDENTE

Anche i linfociti B sono soggetti a meccanismi di tolleranza immunologica simili a quelli dei linfociti T, inoltre il recettore BCR subisce impermutazioni che possono determinare una cross reattività con antigeni self per una similarità di epitopi con antigeni estranei, per questo motivo anche i linfociti B devono subire processi di induzione alla tolleranza sia durante il loro sviluppo che dopo l'incontro con l'antigene nei tessuti linfatici secondari

I meccanismi di tolleranza nelle cellule B sono la delezione clonale e l'anergia clonale, la comprensione di questi meccanismi è avvenuta tramite degli esperimenti con topi transgenici il primo spiega la tolleranza mediata dalla delezione clonale, e il secondo mediante l'anergia clonale

in topi con aplo tipo non b è stato inserito il gene H2kb una molecola MHC di classe 1 sotto il promotore metallotioneina per farlo esprimere a livello epatico

in altri topi è stato inserito il gene anti H2Kb e sono stati incrociati insieme ed è stata ottenuta una prole che esprime la proteina, ma non producono anticorpi, quindi le cellule autoreattive vengono distrutte parzialmente nella milza e totalmente nei linfonodi, questo è un esempio di tolleranza periferica mediante delezione clonale.

Nel secondo esperimento una linea murina ha ricevuto il gene per il lossozoma dell'uovo di pollo

HEL associato ad un promoter tessuto specifico, e una seconda linea ha ricevuto il transgene per gli ig anti HEL molto solubile che rende tolleranti sia i linfociti B che i T, la prole doppio transgenica risulta altamente tollerante ad HEL e non produce autoanticorpi, questo perchè le cellule autoreattive non vengono eliminate ma non esprimono IgM di superficie ma solo le IgD esempio di anergia clonale.

Le tappe di maturazione dei linfociti B avvengono nel midollo osseo, il primo evento nelle cellule pro-B è l'espressione delle molecole CD 79 a e CD 79 b .

nello stadio successivo le cellule Pre-B si ha un riaraggiamento delle VDJ della catena pesante che compare sulla superficie cellulare in associazione con i CD79 a e b e un surrogato della catena leggera.

Nella progressione delle cellule avviene anche la ricombinazione nel locus della catena leggera a questo punto le cellule B non esprimono ancora le igD di membrana nella progressione dello sviluppo le cellule B esprimeranno le IgD e le IgM di membrana, la tolleranza al self inizia quando le cellule esprimono le IgM di membrana se le cellule risultano autoreattive il loro sviluppo si arresta ma avviene un riaraggiamento della catena leggera e mediante l'editing del recettore anche le cellule B potenzialmente reattive possono progredire il loro sviluppo, in questo modo il sistema immunitario potenzia il proprio repertorio.

Le immunoglobuline IgM sono più espresse rispetto alle IgD e questo può assicurare in periferia la morte per apoptosi delle cellule autoreattive.

2.14 Tolleranza B periferica:

l'eliminazione delle cellule reattive B avviene nella milza nella zona T dipendente queste cellule hanno vita breve ma possono contribuire comunque alla risposta immunitaria di un soggetto, questo perchè il sistema immunitario è fatto in modo che si possa rispondere a più infezioni possibili.

Anche i recettori dei linfociti B della memoria possono andare incontro a ipermutazione vengono eliminati dal repertorio linfocitario.(19)

2.15 TREG E AUTOIMMUNITA':

Attualmente, l'alterazione quantitativa e qualitativa della funzione T regolatoria viene indicata fra i principali fattori implicati nella genesi dei fenomeni autoimmuni. Il coinvolgimento dei linfociti Treg nell'instaurazione di manifestazioni autoimmuni è confermato dall'osservazione degli effetti osservati nel topo dopo timectomia in epoca neonatale . Il timo costituisce, infatti, la sede di sviluppo e maturazione dei linfociti Treg naturali e la loro deplezione indotta da timectomia produce manifestazioni simili a quelle osservate nella sindrome IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked) (20) In questa sindrome, le mutazioni del gene codificante per il fattore di trascrizione Foxp3 sono associate a scomparsa dei linfociti Treg e, pertanto, all'insorgenza, sin dall'età neonatale, di diabete mellito tipo I, anemia emolitica, malattie infiammatorie croniche autoimmuni dell'intestino e dermatite eczematosa, oltre al riscontro di intensa infiltrazione tissutale linfocitaria , elevati livelli sierici di IgE , eosinofilia ed evidente tendenza dei linfociti T CD4+ a manifestare una secrezione citochinica di tipo Th2 . Da ciò si evince che l'attività dei linfociti Treg, sia naturali che indotti, si esplica mediante soppressione antigene-specifica dei cloni linfocitari autoreattivi eventualmente sfuggiti alla selezione centrale timica. Di conseguenza, alla funzione dei Treg può essere ricondotta l'apparente discrepanza fra l'elevata frequenza con la quale è possibile isolare linfociti T autoreattivi dal sangue periferico di

soggetti sani e la bassa prevalenza delle patologie autoimmuni. (21) Il ruolo putativo dei Treg nelle malattie autoimmuni è esemplificato dalle seguenti evidenze sperimentali. Il numero di Treg nel sangue periferico dei soggetti con diabete tipo I è risultato sovrapponibile ai controlli sani ma la loro abilità inibitoria nei confronti dei linfociti T CD4⁺ effettori è risultata marcatamente ridotta. A tal proposito, Michalek et al. 30 hanno Ruolo dei linfociti CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nelle patologie autoimmuni dimostrato come il difetto dell'attività regolatoria aumenti in proporzione alla presenza di alleli MHC di classe II ritenuti fortemente a rischio per lo sviluppo di diabete. Infine, la depressa funzione T regolatoria favorirebbe, nei soggetti geneticamente predisposti, l'espansione dei cloni linfocitari T autoreattivi innescata da Coxsackie virus B4, agente implicato nella patogenesi del diabete mellito tipo I. (22) Per converso, nei topi NOD, l'espansione dei Treg determina una riduzione del rischio di sviluppo del diabete 31. La relazione tra artrite reumatoide e Treg è ancora oggi oggetto di studio. Sembra comunque che, nei soggetti affetti da artrite reumatoide, non siano presenti di per sé anomalie qualitative o quantitative a carico dei Treg. Infatti, la frequenza di questi ultimi nel sangue periferico è spesso sovrapponibile ai controlli sani ma inferiore a quella rilevata a livello articolare, come conseguenza di una redistribuzione indotta dagli stimoli chemiotattici liberati durante il processo infiammatorio. Inoltre, i Treg isolati dal liquido sinoviale differiscono dai Treg circolanti in quanto esprimono CD45RO⁺ (fenotipo caratteristico delle cellule della memoria) e numerosi marcatori di attività. I Treg che migrano dal sangue presso le sedi del processo infiammatorio cronico maturano e sviluppano un fenotipo maggiormente immunosoppressivo 35-37 in vitro ma insufficiente ad ottenere la remissione in vivo. (23) Questo paradosso è frutto del microambiente citochinico che si instaura presso le articolazioni infiammate, in grado di proteggere i linfociti T autoreattivi dalle attività immunosoppressive dei Treg. È stato ipotizzato che un difetto dell'attività regolatoria sia coinvolto anche nella patogenesi della sclerosi multipla. È stato rilevato nei pazienti affetti da sclerosi multipla remittente una riduzione dei Treg nel sangue periferico, della loro attività in vitro e del grado di espressione di Foxp3. Tali risultati erano confermati da alcuni autori ma confutati da altri. Anche il confronto del sangue periferico con il liquido cerebro-spinale fra soggetti sani e pazienti ha prodotto nei vari studi conclusioni contrastanti. Diversi studi hanno evidenziato l'importanza del ruolo dei Treg presso la mucosa intestinale. Tale distretto è, infatti, continuamente esposto, dalla nascita in poi, ad antigeni non self derivanti dalla dieta e soprattutto dalla microflora batterica locale. Una riduzione della funzione T regolatoria potrebbe, pertanto, sottendere lo sviluppo delle malattie infiammatorie intestinali, caratterizzate da un'abnorme attivazione del sistema immunitario in senso Th1/Th17 nel morbo di Crohn e in senso Th2 nella rettocolite ulcerosa. Analisi condotte su biopsie di mucosa intestinale provenienti da soggetti affetti da malattie infiammatorie intestinali hanno mostrato un aumento locale del numero di Treg in contrasto con quanto rilevato nel sangue periferico 43-47. Inoltre, a differenza di quanto osservato nell'artrite reumatoide, la capacità immunosoppressiva di queste cellule in vitro non appare ridotta (24). Nonostante ciò, il processo infiammatorio non appare controllato dai Treg reclutati in situ, presumibilmente per l'interferenza di predominanti fattori pro-infiammatori. Per quanto concerne il lupus eritematoso sistemico, la concentrazione periferica dei Treg appare ridotta (in uno scenario di globale espansione dei linfociti T CD4⁺ CD25⁻ effettori), aumentata (in associazione a trattamento terapeutico) o paragonabile a quella dei soggetti sani, a fronte, comunque, di una funzione generalmente deteriorata. (25) Ciò è in accordo con la sistemica riduzione della tolleranza immunitaria osservata in questi pazienti. L'approccio opposto, ovvero l'utilizzo dei Treg per domare manifestazioni autoimmuni, è stato, al pari, oggetto di diversi studi. Tentativi terapeutici fondati sul trasferimento di cellule T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ specifiche sono già stati realizzati in modelli animali di encefalite autoimmune allergica, diabete mellito tipo I e malattie infiammatorie croniche dell'intestino. In ognuno di questi modelli sperimentali, si è osservato un importante aumento della concentrazione tissutale specifica di citochine immunosoppressive (TGFβ ed IL-10), dell'infiltrazione Treg e un conseguente miglioramento del

quadro clinico o la prevenzione delle manifestazioni autoimmuni. (26) Un altro efficace approccio terapeutico consisterebbe nell'induzione diretta in vivo dei linfociti Treg a partire dai linfociti CD4+CD25- attraverso, per esempio, l'impiego di citochine quali IL-10 e TGF- β . Queste strategie chiaramente offrono a considerare come comune contraltare la teorica promozione di neoplasie e patologie infettive. (27) IL-17 è prodotta da cellule CD4 + (Th17) sono un sottoinsieme di cellule T effettrici helper noti a svolgere un ruolo importante nella difesa dell'ospite contro funghi e batteri extracellulari, ma anche coinvolto nell'infiammazione dei tessuti e nelle malattie autoimmuni come la sclerosi multipla, malattia infiammatoria intestinale, e l'artrite reumatoide. La funzione delle cellule Th17 dipende dalla gamma di citochine prodotte e l'equilibrio tra citochine proinfiammatorie e citochine antinfiammatorie. Cellule Th17 autoreattive producono IFN- γ e GM-CSF e in un modello murino provocano l'EAE, mentre le cellule Th17 producono IL-10 non la provocano. È stato recentemente dimostrato che le cellule Th17 umane C albicans specifiche producono IL-17 e IFN- γ , mentre S. aureus-specifiche cellule producono IL-17 e, dopo restimolazione, IL-10. Mentre l'ontologia delle due diverse sottopopolazioni Th17 è stato chiarito, rimane ancora sfuggente qual è il circuito trascrizionale che regola l'espressione della IL-10. Utilizzando una combinazione di profilo trascrizionale e approccio epigenetico, è stato identificato il fattore di trascrizione c-MAF come candidato per la regolazione della produzione di IL-10 in cellule Th17 umane, quindi potenzialmente rappresenta un fattore discriminante tra il patogeno e non patogeno. (20)

2.16 Il ruolo dei miRNA delle malattie autoimmuni

I microRNA (miRNA) sono piccoli, acidi ribonucleici (RNA non codificanti) che giocano un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione del genoma dell'ospite a livello post-trascrizionale. Negli ultimi 20 anni, miRNA sono emersi come regolatori chiave di vari processi biologici, tra cui la maturazione delle cellule del sistema immunitario, la differenziazione, e il mantenimento dell'omeostasi immunitaria. Pertanto, non è sorprendente che i modelli di espressione miRNA sregolati ora sono stati documentati in una vasta gamma di malattie tra cui il cancro e le malattie infiammatorie e autoimmuni. Questo campo in rapida crescita ha rivoluzionato la nostra comprensione di immunoregolazione normale e il concetto di auto-tolleranza. Questa recensione si concentra sulle attuali conoscenze di miRNA biogenesi, il ruolo dei miRNA nella regolazione dell'immunità innata e adattiva, e l'associazione dei miRNA con malattie autoimmuni. È stato osservato che la disregolazione dei miRNA abbia un ruolo nel lupus eritematoso sistemico (LES), l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla. Dato che la maggior parte delle malattie autoimmuni si sviluppa in modo predominante nel sesso femminile si è discusso della regolazione degli ormoni sessuali dei miRNA nelle risposte infiammatorie, con l'accento sugli estrogeni, che ora è stato dimostrato che regolano miRNA nel sistema immunitario. Il campo di regolazione dei geni miRNA di mammifero ha un potenziale enorme. L'identificazione di specifici pattern di espressione miRNA nelle malattie autoimmuni, così come una comprensione globale del ruolo dei miRNA nella patogenesi della malattia offre la promessa non solo di marcatori diagnostici molecolari, ma anche nuove strategie di terapia genica per il trattamento LES e altre malattie infiammatorie autoimmuni. (21)

CAPITOLO 3

Connettiviti:

Le connettiviti sono malattie reumatiche autoimmuni sistemiche, caratterizzate da un coinvolgimento dell'apparato muscoloscheletrico, a patogenesi autoimmune e con un esteso coinvolgimento tissutale. Le principali connettiviti sono: il lupus eritematoso sistemico (LES), la sclerosi sistemica progressiva o sclerodermia (SSc); la polimiosite-dermatomiosite (PDM), la sindrome di Sjögren primitiva (SSp); l'artrite reumatoide (AR); la connettivite indifferenziata, (UCTD) le connettiviti da sovrapposizione, di cui la più frequente è la connettivite mista (CM) o sindrome di Sharp. Tali patologie sono caratterizzate dal coinvolgimento sistemico, in quanto sono malattie caratterizzate da un processo infiammatorio cronico a carico del tessuto connettivo diffuso in tutto l'organismo.

La patogenesi è molto complessa, in cui è coinvolta sia l'immunità innata che quella acquisita, ed avviene a seguito di determinati eventi:

Aumento dell'apoptosi e difetto della clearance del materiale apoptotico con aumento della presentazione di autoantigeni.

attivazione e differenziazione dei linfociti B e T autoreattivi

il danno d'organo mediato da anticorpi, immunocomplessi e complemento e linfociti T

3.1- LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

Il lupus eritematoso sistemico è una malattia infiammatoria cronica autoimmune con un coinvolgimento multi organo, è classificata come connettivite per l'interessamento muscolo scheletrico, da studi epidemiologici negli stati uniti e gran bretagna la prevalenza del Les risulta essere maggiore nella popolazione nera fino a 5 volte superiore a quella caucasica.

La prevalenza in Italia si stima sia intorno a 20 pazienti ogni 100.000 abitanti, il rapporto F/M è di 9/1, l'età di insorgenza varia dai 25 ai 40 anni.

Il LES è caratterizzato da una alterazione della risposta immunitaria che determina l'attivazione delle cellule T autoreattive e alla produzione di anticorpi contro gli antigeni nucleari.

I sintomi più frequenti sono: eritema a farfalla, dolori articolari, proteinuria, pericardite, pleurite, interessamento renale e del sistema nervoso centrale.

Può essere presente una anemia emolitica, linfopenia, linfadenomegalia., esistono dei criteri per la diagnosi del LES creati nel 1982 e rivisti dall'America College of Rheumatology (ACR) che riportano sintomi specifici e almeno 4 di essi devono essere presenti per classificare un paziente affetto da LES.

Nella patogenesi del LES svolge un ruolo determinante un aumento dell'apoptosi, con difetto della fagocitosi dei detriti cellulari con modificazione di autoantigeniche stimolano il sistema immunitario alla produzione di autoanticorpi.

Alcuni autoanticorpi possono essere patogenetici, protettivi e inoltre alcuni non sono specifici ma presenti anche in altre malattie autoimmuni.

Questi criteri sono stati elaborati nel 1982, rivisti nel 1997 dall'American College Rheumatology (ACR)

1. Eritema a farfalla
2. Eritema Discoide
3. Fotosensibilità
4. Ulcere orali
5. Artrite
6. Sierosite
7. Glomerulonefrite proteinuria > 0.5 g al giorno e cilindri cellulari
8. Manifestazioni neurologiche
9. Alterazioni ematologiche
-linfopenia, trombocitopenia.
10. presenza di anticorpi anti -Ds DNA, anti Sm antifosfolipidi, positività al lupus anticoagulante
11. Autoanticorpi antinucleo.

(devono essere presenti almeno 4 criteri)

Tabella 1 ripresa da R Tozzoli N.Bizzarro V.Villalta E.Tonutti “ il laboratorio nelle malattie reumatiche autoimmuni. “Esculapio Bologna (2007).

Questa classificazione presenta dei limiti non è incluso il lupus cutaneo subacuto che nel 50% dei casi ha manifestazioni sistemiche, mentre è stato incluso il lupus cutaneo cronico che presenta sintomi sistemici solo nel 1-5% dei casi.

Il contributo del laboratorio nella diagnosi del LES è di fondamentale importanza, sia nella diagnosi che nel decorso della malattia.

Il primo test di laboratorio per la diagnosi del LES per la rivelazione di autoanticorpi era LE test oggi sostituito da altri dosaggi molto più sensibili e specifici anche se studi di correlazione tra metodi evidenziano una significativa variabilità analitica.

Principali autoantigeni

Acidi nucleici

dsDNA, U1RNA, tRNA

Proteine associate al DNA

Istoni (H1,H2A,H2B,H3,H4)

Ku (p 70-P80)

PCNA

Proteine centromeriche

DNA topoisomerasi I funzione enzimatica (Scl 70)

Proteine associate all'RNA :

Proteine spliceosomiali (U1RNP, Sm,U2RNP, hnRNP,

Proteine nucleolari (U3 snoRNP/ fithbrillarina, Th/t0, PB, RNP ribosomiali, tRNA sintetasi con funzione enzimatica enzimatica, sintesi tRNA istidina,treonina,alanina,(jo-1, PL-7,PL 12).

Tabella 2 ripresa da R Tozzoli N.Bizzarro V.Villalta E.Tonutti “ il laboratorio nelle malattie reumatiche

Questa classificazione presenta dei limiti non è incluso il lupus cutaneo subacuto che nel 50% dei casi ha manifestazioni sistemiche, mentre è stato incluso il lupus cutaneo cronico che presenta sintomi sistemici solo nel 1-5% dei casi.

Il contributo del laboratorio nella diagnosi del LES è di fondamentale importanza, sia nella diagnosi che nel decorso della malattia.

Il primo test di laboratorio per la diagnosi del LES per la la rivelazione di autoanticorpi era LE test oggi sostituito da altri dosaggi molto più sensibili e specifici anche se studi di correlazione tra metodi evidenziano una significativa variabilità analitica.

3.2Eziopatogenesi:

I fattori predisponenti la malattia sono genetici, endocrini, ambientali.

Tra i fattori genetici risulta significativa l'associazione della malattia con alcuni geni del sistema HLA di classe II e di classe III , tra gli alleli di classe II i più importanti risultano essere DR e DQ , per quanto riguarda gli alleli di classe III è nota una associazione con i geni che codificano per le frazioni del complemento C2,C4

tra i fattori endocrini è evidente che la prevalenza della malattia si osserva nella donna in età fertile, rivelando che gli estrogeni svolgano un ruolo nell'autoimmunizzazione.

Tra i fattori ambientali si ritrovano i microrganismi come il virus dell'herpes simplex, varicella zoster , i raggi UV Alcuni farmaci come la cloropromaziona, l'idralazina, l'isonazie, procramide e pennicellina sono in grado di provocare una entità clinica ben definita il Lupus indotto da farmaci.

Il LES è caratterizzato da importanti alterazioni della risposta immunitaria che determinano l'attivazione del linfociti T ed una produzione di anticorpi diretti contro gli antigeni nucleari.

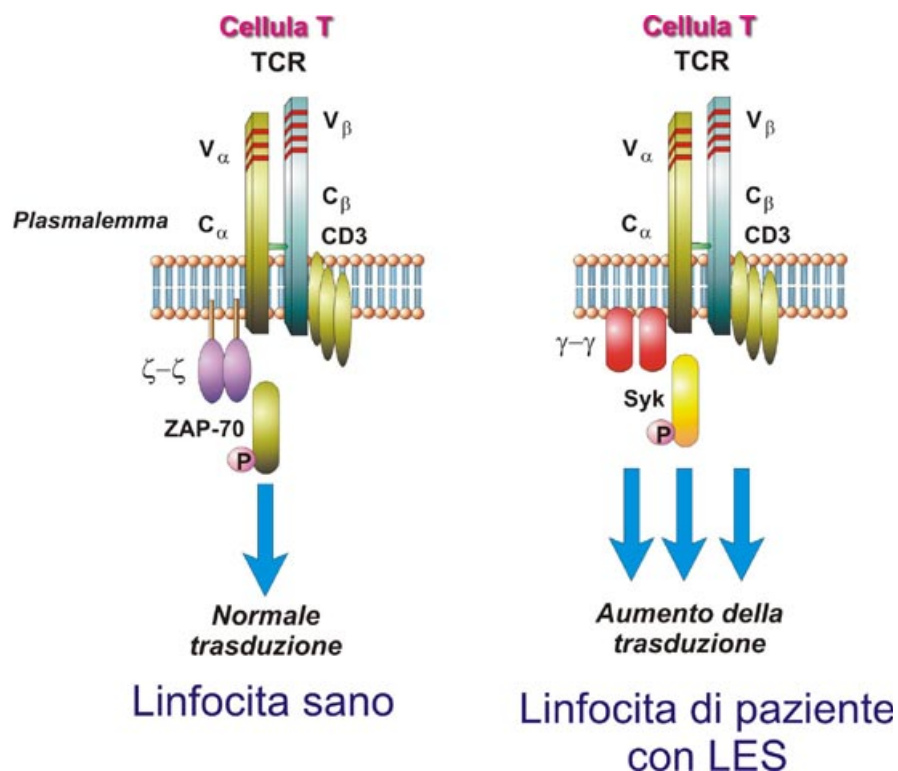
In molti studi è stato osservato un aumento della produzione dei corpi apoptotici di cellule mononucleate e ridotta clearance, questa alterazione provocherebbe il rilascio di antigeni

immunogeni.

È stato dimostrato che i linfociti T helper dei soggetti affetti da LES hanno una eccessiva risposta precoce calcio dipendente alla stimolazione del recettore TCR, ed è stata individuata una sostituzione della catena γ del recettore Fc ϵ R γ con una catena ζ .

L'aumento della risposta T calcio dipendente causa un blocco della trascrizione della IL 12, aumento della produzione di INF α citochina pro-infiammatoria.

È stata anche osservata una ridotta espressione dei CRI del complemento con ridotta capacità di eliminare gli immunocomplessi.



I meccanismi con cui gli anticorpi provocano danni è la formazione di immunocomplessi circolanti che depositandosi sui tessuti attivano il complemento con azione citolitica diretta sulla superficie di globuli rossi, bianchi, piastrine, tessuti.

3.3 EPIDEMIOLOGIA

Colpisce prevalentemente il sesso femminile 9:1 l'età di insorgenza va dai 25-40 anni , l'incidenza della malattia varia in base al gruppo etnico considerato, ma si stima che l'incidenza sia 1 ogni 5000 abitanti

3.4 Quadro Clinico Lupus Eritematoso Sistemico

Sintomi generali:

Astenia

Malessere generale

Anemia

Febbre

Manifestazioni Articolari

Atralgie

deformità (sindrome di Jaccoud)

Manifestazioni Cutanee

Eritema a farfalla

Manifestazioni mucose**Coinvolgimento Renale**

Glomerulonefrite Lupica

Alterazioni Ematologiche**Manifestazioni Pleuropolmonari****Manifestazioni gastroenteriche****Manifestazioni Neurologiche****Manifestazioni pancreatiche e polmonari****Manifestazioni Oculari****Manifestazioni Cardiache**

3.5 L'ARTRIDE REUMATOIDE:

L'artrite reumatoide è una patologia cronica infiammatoria autoimmune, che colpisce le articolazioni diartrodiali con membrana sinoviale nelle quali si osserva una distruzione dei capi ossei iuxta-articolari. Il termine "artrite reumatoide" fu coniato da sir Alfred Bering Garrod nel 1876 e fu adottato definitivamente dall'American Rheumatism Association (ARA) nel 1941 (1). Si tratta di una malattia infiammatoria cronica, a carattere sistemico con sintomi. Potenzialmente può interessare ogni distretto dell'organismo, ei iuxta-articolari e all'anchilosi. L'artrite reumatoide presenta, quindi, un'espressività clinica polimorfa, in relazione alla topografia, al grado di evoluzione dell'impegno articolare e alla possibile presenza di manifestazioni extra-articolari.

3.6 EPIDEMIOLOGIA L'artrite reumatoide è una malattia ubiquitaria, senza predilezione di razza o di clima, la prevalenza è genericamente dello 0,3 - 2%; in Italia uno studio ha dimostrato una prevalenza dello 0,33% nella popolazione generale, dello 0,13% negli uomini e 0,51% nelle donne (2). L'incidenza negli uomini è di 0,1 - 0,2 nuovi casi / 1000 abitanti / anno, mentre nelle donne è di 0,2 - 0,4 casi / 1000 abitanti / anno. Le femmine sono quindi più colpite che gli uomini, con un rapporto maschi / femmine di 1 : 2 / 1 : 4. L'esordio della malattia può avvenire a qualunque età, anche se è più frequente in soggetti di età compresa tra i 40 e i 60 anni.

3.7 Quadro Clinico

Poliartrite a distribuzione simmetrica, dolore articolare tumefazione, arrossamento, e funzioni limitate, rigidità articolare soprattutto la mattina. Può essere presente febbre e astenia.

Le articolazioni colpite sono le interfalangee prossimali e le metacarpofalangee con dolore alla compressione, deficit di forza, versamenti, tutte le ossa con membrana sinoviali possono essere colpite comprese quelle cervicali, tra i segni con prognosi sfavorevole c'è la presenza del nodulo reumatico che possono formarsi ovunque la malattia può insorgere in modo insidioso con iniziali atalgie sporadiche destinate comunque ad un andamento progressivo, e con una alta probabilità di invalidità futura.

Diagnosi

La diagnosi generalmente viene effettuata su base clinica esistono tuttavia dei marcatori immunologici sensibili e specifici per individuare e soprattutto differenziare la patologia rispetto alle altre autoimmuni con quadri simili e sono i Fattori reumatoidi e gli anticorpi peptidi citrullinati, anti Ra33, possono essere presenti anche gli ANA generalmente a basso titolo e gli anti citoplasma dei neutrofili (ANCA).

I fattori reumatoidi I FR sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti contro determinanti antigenici presenti nella regione costante (frammento Fc) delle catene pesanti delle IgG. Possono appartenere a tutte le classi anticorpali, anche se la più rappresentata è la classe IgM. I FR presenti nell'AR riconoscono le IgG umane, sono dotati di affinità elevata e possono essere di isotipi. Metodi di dosaggio del FR I metodi di dosaggio del FR sono numerosi. Il primo test ad essere impiegato e ancora parzialmente in uso, è la classica reazione di Waaler-Rose, non molto sensibile ma dotata di elevata specificità, che nella sua formulazione originale utilizzava emazie di montone sensibilizzate con immunoglobuline di coniglio. Oggi è stata sostituita da una variante in cui al

posto delle emazie di montone si utilizzano particelle di lattice. Questi metodi si basano sul principio della agglutinazione e sono semiquantitativi. Nella maggior parte dei laboratori, però, tali metodiche sono state ampiamente sostituite da metodi nefelometrici, che usano particelle di lattice sensibilizzate con IgG umane, oppure nefelometrici o turbidimetrici basati sulla precipitazione di aggregati solubili di IgG umane^{10,11}. Tali sistemi sono quantitativi, standardizzati sulla preparazione internazionale di riferimento¹², riproducibili e automatizzabili. Va comunque segnalato che il principale limite delle procedure sopra descritte è rappresentato dal fatto che sono in grado di rilevare preferenzialmente FR di tipo IgM. Il Valore diagnostico del FR La sensibilità diagnostica del FR per l'AR è abbastanza elevata (tra il 75 e l'80%) e comunque è fortemente influenzata dalla selezione clinica dei pazienti e dalla durata della malattia, dal momento che la percentuale di positività aumenta in genere col passare del tempo. Nella pratica clinica si ricerca usualmente il FR IgM. Qualora il sospetto clinico di AR sia elevato la determinazione di FR di isotipo differente può avere una certa importanza nei casi di negatività del FR IgM. Uno dei maggiori problemi del FR è che, pur essendo uno dei criteri classificativi di malattia proposti dall'ACR³, non è del tutto specifico potendosi riscontrare, anche ad alto titolo, in numerose malattie del connettivo come la sindrome di Sjögren, dove può essere presente fino al 70% dei casi, ma anche nel LES e nella sclerodermia, così come nella crioglobulinemia, in alcune malattie linfoproliferative e in numerose malattie infettive, sia batteriche che virali. Inoltre, il FR può essere presente, senza significato clinico, anche nel 4-5 % dei soggetti sani.

Gli anticorpi anti filaggrina e anti peptidi citrullinati sono i marcatori più specifici e con un alto valore predittivo positivo nei pazienti con AR.

Gli anticorpi anti filaggrina sono rivolti verso una proteina responsabile della polimerizzazione della citocheratina prodotta negli ultimi stadi della differenziazione delle cellule epiteliali squamose, sono stati definiti AFA..

Le proteine citrullinate vengono prodotte in seguito al clivaggio della profilaggrina che in seguito a modificazioni da parte dell'enzima peptid arginina deiminasi viene defosforilato il residuo di arginina e deiminato a citrullina carica negativamente, il clivaggio della profilaggrina determina la produzione di frammenti citrullinati che vengono riconosciuti dagli anticorpi .

Tutta via la filaggrina non è presente nelle sinoviali e quindi probabile che sia una cross reattività verso altre proteine che subiscono lo stesso processo di deiminazione.

I test di ultima generazione utilizzano vimentina citrullinata geneticamente modificata che ha aumentato notevolmente la sensibilità e la specificità dei test più datati.

Sono molto utili per la diagnosi differenziale, anche se alcuni pazienti affetti da AR possono non produrre anticorpi citrullinati, questo è dovuto ad un particolare polimorfismo HLA di classe II DRB1 (Shared epitope), la presenza di questo epitopo sarebbe responsabile della produzione di anticorpo , questo è stato dimostrato dal gruppo olandese di Leiden.

Gli anticorpi anti CCP hanno dimostrato di avere un elevato significato prognostico, per lo sviluppo dell'artrite erosiva, ma non si sono dimostrati utili nel monitoraggio della malattia

3.8 LA SINDROME DI SJOGREEN (si pronuncia Sciogren) è una malattia infiammatoria

cronica di natura autoimmune del tessuto connettivo, caratterizzata da una infiammazione cronica che colpisce le ghiandole salivari e lacrimali che conduce ad un danno ghiandolare. Può avere anche un interessamento sistemico, il sesso femminile è coinvolto più di quello maschile con un rapporto 10:1, detta anche sindrome sicca. Nella sindrome di Sjögren la flogosi cronica è dovuta prevalentemente ad un meccanismo T cellulare, a livello ghiandolare si assiste ad una infiltrazione di linfociti T con prevalenza dei CD4+

I sintomi vanno dalla secchezza delle fauci o bocca secca (xerostomia) ed occhio secco (cheratoconjuntivite secca). Come altre malattie autoimmuni, la Sindrome di Sjögren può danneggiare organi vitali e presentare una sintomatologia tipica caratterizzata da livelli di intensità variabile: alcuni pazienti possono avere dei sintomi molto lievi di xerostomia e xeroftalmia, mentre altri possono alternare periodi di ottima salute seguiti da periodi di acuzie (tumefazioni parotidea, artralgie, febbre).

La sindrome di Sjögren viene classificata in:

Primaria: le ghiandole lacrimali e salivari sono infiltrate e la loro attività secretiva è compromessa, in assenza di altre malattie autoimmuni.

Secondaria: quando i sintomi specifici, xerostomia e xeroftalmia, sono concomitanti ad altre malattie del tessuto connettivo, approssimativamente il 50% delle persone affette da Sindrome di Sjögren è di tipo secondario.

3.9 Epidemiologia

Frequente nel sesso femminile e colpisce generalmente le persone di mezza età.

3.10 Quadro clinico e Diagnosi

Molte malattie possono presentare alcuni aspetti clinici comuni alla SS, tra queste la sarcoidosi, l'infezione da virus C dell'epatite, quella da HIV, l'amiloidosi, la sclerosi multipla, l'anoressia nervosa. Anche numerosi farmaci di uso comune (ansiolitici, anti-depressivi, anti-istaminici, alcuni anti-ipertensivi, diuretici etc. etc) possono indurre xerostomia e xeroftalmia ponendo problemi di diagnostica differenziale. Una volta escluse possibili altre cause di sindrome sicca attraverso un'attenta raccolta della storia clinica del paziente (anamnesi) ed esami ematochimici che escludano la presenza del virus dell'epatite C (molto diffuso presso alcune popolazioni) viene intrapreso un iter clinico complesso che si avvale di esami di laboratorio e di test strumentali atti a valutare la sindrome sicca. Esami di laboratorio: La SS è una patologia autoimmune caratterizzata da diverse anomalie sierologiche che possono facilmente essere evidenziate con un esame del sangue eseguito presso laboratori specializzati. E' necessario eseguire un emocromo, il protidogramma che permette di evidenziare una aumentata produzione di immunoglobuline (l'iperattività dei linfociti B determina infatti una aumentata produzione di immunoglobuline con attività autoanticorpale), la VES (velocità di eritrosedimentazione) e il complemento. Tra gli autoanticorpi vanno ricercati gli ANA (anticorpi anti nucleari) e gli ENA (anticorpi contro gli antigeni nucleari estraibili), tra questi ultimi assume carattere diagnostico la presenza di 2 anticorpi in particolare: gli anti-Ro/SSA e gli anti-La/SSB. E' importante completare gli esami ematochimici con la ricerca del fattore reumatoide e con la ricerca delle crioglobuline (immunoglobuline che precipitano alle basse temperature) la cui presenza, spesso associata alla comparsa di porpora agli arti inferiori, è inclusa tra i fattori prognostici dello sviluppo del linfoma. In un terzo dei pazienti con SS primaria e secondaria sono stati descritti gli anticorpi anti-tiroidei microsomiali (che spesso si associano allo sviluppo di una

tireopatia autoimmune) e gli anti-cellule parietali gastriche (APCA) associati a gastrite atrofica e gli AMA (anticorpi anti mitocondrio) che possono associarsi allo sviluppo di un interessamento infiammatorio epatico in corso di SS. Per indagare la secchezza oculare si utilizzano semplici esami che valutano il film lacrimale in modo qualitativo e quantitativo. Il test di Schirmer evidenzia un'eventuale riduzione del secreto lacrimale tramite l'applicazione di una strisciolina di carta bibula nel fornice congiuntivale per 5 minuti. Un altro test è il break-up time (BUT) che misura il tempo di rottura del film lacrimale. Entrambi i test possono essere effettuati ambulatorialmente durante una visita oculistica. Per indagare la presenza di xerostomia l'esame dotato di maggiore specificità e sensibilità è rappresentato dalla biopsia delle ghiandole salivari minori. Tale esame consiste nella biopsia di una delle piccole ghiandole salivari presenti all'interno del labbro inferiore; è un esame di semplice esecuzione e può essere eseguito a livello ambulatoriale. Tra le altre metodiche diagnostiche utilizzate per la valutazione delle ghiandole salivari abbiamo l'ecografia delle ghiandole salivari maggiori che offre la possibilità di valutare l'aspetto omogeneo (normale) o disomogeneo del parenchima ghiandolare (in caso di infiammazione), la scialometria che misura i tassi di flusso salivare con o senza stimolo, mentre la scialografia parotidea, meno usata perché prevede l'incannulamento del dotto di Stenone, evidenzia le alterazioni anatomiche a livello del sistema duttale. Infine la scintigrafia consente una valutazione funzionale molto sensibile ma poco specifica.

Recentemente sono stati stilati dei nuovi criteri diagnostici per la SS di seguito riportati tabella 1. Tabella 1. Criteri diagnostici dell'American-European Consensus Group⁶⁷. (Vitali C, 2002)

I. Sintomi oculari: risposta positiva ad almeno uno dei seguenti quesiti: 1. Secchezza e fastidio oculare quotidiano e persistente per un periodo superiore a tre mesi 2. Sensazione ricorrente di sabbia negli occhi e di corpo estraneo 3. Utilizzo di lacrime artificiali più di tre volte al giorno II. Sintomi orali: risposta positiva ad almeno uno dei seguenti quesiti: 1. Sensazione di secchezza orale quotidiana per un periodo superiore a tre mesi 2. Tumefazioni parotidiche ricorrenti o persistenti 3. Utilizzo di liquidi per l'ingestione di cibi secchi III. Segni oculari: positività ad almeno uno dei seguenti test: 1. Test di Schirmer (<5 mm in 5 minuti) 2. Test al Rosa Bengala (score >4 secondo Von Bijsterveld) IV. Esame istopatologico: Reperto di sialoadenite linfocitica focale nella biopsia delle ghiandole salivari minori ottenuta da una mucosa apparentemente normale e valutata da un esperto istopatologo, con un focus score ≥ 1 , definito come il numero di foci linfocitari adiacenti ad acini di mucosa apparentemente normale e contenenti più di 50 linfociti per 4 mm² di tessuto ghiandolare V. Ghiandole salivari: interessamento delle ghiandole salivare documentato dalla positività di almeno uno dei seguenti test: 1. Scintigrafia delle ghiandole salivari 2. Scialografia delle parotidi 3. Misura del flusso salivare non stimolato ($\leq 1,5$ ml in 15 minuti) VI. Autoanticorpi: presenza nel siero dei seguenti anticorpi: 1. Anticorpi anti-Ro (SSA) o anti-La (SSB), o entrambi Per la Sindrome di Sjögren primaria In pazienti privi di altra patologia potenzialmente associata, la SS primaria può essere definita come segue: a. La presenza di almeno 4 dei 6 criteri è indicativa di SS primaria, purché siano soddisfatti i criteri V (istopatologia) o VI (sierologia). b. Presenza di almeno tre dei quattro criteri obiettivi (cioè III, IV, V, VI)

3.11 SCLEROSI PROGRESSIVA

patologia caratterizzata da un progressivo ispessimento della cute, e del tessuto sottocutaneo, con coinvolgimento degli organi interni, esistono diverse forme e la classificazione si basa sull'entità della diffusione e del coinvolgimento cutaneo

dcSSc interessamento cutaneo diffuso

lcSSc interessamento limitato

le sue forme sono associate a pattern anticorpali e prognosi differenti

nelle forma dcSSc il pattern anticorpale osservato sono gli anticorpi anti topoisomerasi , mentre la lcSSc è associata ad anticorpi anti centromero.

La sclerodermia si riscontra con maggior frequenza nel sesso femminile con un rapporto 5:1 , l'insorgenza avviene tra i 30-50 anni di età , la prevalenza della malattia si aggira intorno ai 220-280 casi per milione di abitanti.

La diffusione della sclerodermia è diversa in gruppi etnici diversi infatti si riscontra più frequentemente negli Stati Uniti rispetto all'Europa , e nei soggetti Afro Americani la malattia sembra insorgere più precocemente intorno ai 30 anni di età.

Da diversi studi emerge una familiarità della patologia ma sembrano essere soprattutto il fattori ambientali lavorativi come la polvere di silice, e solventi derivati dal petrolio , resine che determinano un interessamento polmonare senza anticorpi anti centromero nel sierologia.

3.12 Eziopatogenesi:

la patogenesi risulta complessa , e sono coinvolti diversi tipo di cellule: i fibroblasti , le cellule epiteliali, e i linfociti B e T . tuttavia il ruolo degli autoanticorpi nella patogenesi è ancora controverso, sono sicuramente un marker specifico della patologia, ma per quanto concerne la loro attività nello sviluppo della sclerodermia non si è giunti ancora ad una conclusione convincente. Mentre la presenza di linfociti T CD4 nella cute dei soggetti con Ssc ha suggerito un loro possibile ruolo nell'infiammazione cronica, con il rilascio di citochine e fattori di crescita Come il TGF-Beta responsabili dell'insorgenza del processo fibrotico, e scompenso delle cellule endoteliali con perdita della loro integrità e ipossia e aumentata produzione di collagene.

Fattori ambientali:

virus come citomegalovirus Herpes, parvovirus B19 sembrano essere coinvolti nella patogenesi della sclerodermia, infatti esiste una analogia tra gli anti topoisomerasi e antigeni retrovirali.

Fattori genetici:

alcuni aplotipi HLA sembrano essere coinvolti a rendere più suscettibili all'insorgenza della malattia a seguito di esposizione a fattori ambientali gli alleli A 30 A 32 DR0101, non solo ma anche l'interessamento cutaneo e sistemico sembra essere associato a diversi aplotipi HLA B62 e

DRB 107 ad un interessamento cutaneo, il B62 e Cw0602 fibrosi polmonae mentre B13 e B65 aumenterebbero il rischio di ipertensione polmonare.

Microchimerismo:

recentemente è stata formulata l'ipotesi che la sclerodermia possa essere un tipo particolare di GVHD, in quanto sono state trovate cellule fetali.

La sclerodermia è una malattia sistemica in quanto si può assistere ad un interessamento cardiaco, (quello più diffuso) e renale (il più raro).

3.13POLIDERMATOMIOSITE:

è una patologia che fa parte delle miositi infiammatorie a carico del muscolo striato

le miopatie infiammatorie vengono classificate in tre forme principali:

Polimiosite PM

Dermatmiosite DM

miosite da corpi inclusi MCI

3.14 Epidemiologia:

il rapporto tra femmine e maschi è di circa 2:1 può esordire sia in età adulta che giovanile, la MCI ha un età di insorgenza intorno ai 50 anni di età sono malattie rare e quindi gli aspetti epidemiologici non sono ancora chiari, la patologia è più frequente nella razza nera.

3.15 Eziologia:

l'eziologia è ancora sconosciuta tutta via il principale tessuto bersaglio della risposta autoimmune nell DM è l'endotelio, e il microcircolo muscolare e cutaneo, la risposta è principalmente umorale con linfociti B e linfociti CD4+ intorno ai vasi.

3.16 I sintomi principali comprendono astenia ingravescente e sintomi cutanei

Classificazione delle manifestazioni cutanee

Patognomiche:

papule di Gottron
Segno di Gottron

Caratteristiche :

Rash eliotropo periorbitale
Aree eritromatose violacee, simmetriche
Teleangectasie periungueali, cuticole distrofiche

Compatibili :

Poichilodermatomiosite
Calcinosi

Esami di laboratorio:

le alterazioni bioumorali che si riscontrano più frequentemente sono :
Aumento del CPK e della mioglobina , AST e aldolasi, alterazioni aspecifiche degli indici di flogosi.

Gli Autoanticorpi:

il test di screening degli autoanticorpi sono gli ANA contro antigeni nucleari o citoplasmatici, il test non è specifico tanto che il 20% dei pazienti risultano negativi, e pertanto deve essere affiancato a test più specifici per la caratterizzazione degli autoanticorpi

che possono essere miociti specifici o miociti associati

Miociti specifici (MSA)

Anti Jo-1 (anti istidil tRNA)
altri anti aminoacil tRNA sintetasi
Anti Mi-2
anti-SRP

Miosite associati (MAA)

Anti RoRNP
Anti -PM /Slc
Anti U1snRNP
Anti Ku

l'anticorpo anti Jo-1 è il più frequente che si osserva con i pazienti PM/DM, gli anti tRNA sintetasi sono più rari, si tratta di enzimi che catalizzano l'amminoacilazione del t RNA .

Per la determinazione di questi autoanticorpi l'immunofluorescenza indiretta non è molto attendibile data la scarsa sensibilità e incapacità di distinguere le diverse sintetasi.

L'anticorpo anti -Mi-2 è l'anticorpo nucleo specifico della miosite.

La proteina Mi-2 fa parte del complesso multi-proteico denominato NuRD responsabile della deacetilazione degli istoni e il rimodellamento ATP dipendente dei nucleosomi cromatinici .

Studi immunogenetici hanno dimostrato che la presenza di triptofano in posizione Beta dell'antigene HLA B7 abbia un ruolo nella produzione dell'anticorpo anti -Mi-2.

Il pattern fluoroscopico è visibile a titoli medio alti e mostrano un pattern nucleare omogeneo.

La determinazione dell'anticorpo anti -Mi-2 è utile nella diagnosi la sua presenza confermata da test specifici ha un alto valore predittivo per la diagnosi di DM.

Gli anticorpi anti SRP , sono rivolti ad un complesso riboproteico soprattutto alla proteina SRP 54 che serve come segnale di riconoscimento per traslocare il peptide sintetizzato sui ribosomi nel reticolo endoplasmatico , è detto anti -signal-Recognition-Particle, anche se la sua presenza è più rara è comunque importante nel suo valore diagnostico e prognostico.

Gli anticorpi miosite associati (MMA)

sono autoanticorpi presenti anche in altre connettiviti e pertanto non sono specifici di DM o PM.

I più importanti sono gli anti -PM/Slc che si trovano nel nucleolo, anti-Ku , anticorpi anti piccole proteine ribocitoplasmatiche RoRNP e nucleari snRNP,

in PM/slc si riscontrano in pazienti sindrome overlap polimiosite/ sclerodermia e nei pazienti PM/slc positivi si osserva un aumento dell'incidenza del fenomeno di Raynaud.

3.17 LA SINDROME ANTIFOSFOLIPIDI

Si tratta di una sindrome caratterizzata da fenomeni trombotici e aborti ricorrenti.

La APS può essere primaria se non associata ad altre patologie autoimmuni, o secondaria, se associata ad altra patologia autoimmune e generalmente con il LES.

Gli autoanticorpi che sono riscontrati sono gli anticorpi anti Cardiolipina IgG e IgM, e gli anti $\beta 2$ glicoproteina1, contro la protrombina e l'annexina V, il test Lac positivo.

3.18 LE VASCULITI

Si tratta di un eterogeneo gruppo di malattie caratterizzato dalla infiammazione e necrosi dei vasi di vario calibro situati in tutti i distretti del corpo, con conseguenti disturbi dovuti ad una ridotta irrorazione come l'ischemia e la necrosi.

Sono presenti anche manifestazioni cutanee, e coinvolgimento sistemico di diversi organi.

Gli organi più colpiti possono essere: il rene, il cervello, i polmoni, i nervi, il cuore e l'intestino.

Vengono classificate in base al calibro del vaso colpito, e l'associazione con gli anticorpi ANCA.

(30)

Vasculiti dei vasi di grosso calibro	Arterite (temporale) a cellule giganti: arterite granulomatosa dell'aorta e dei suoi rami maggiori, predilige i rami extracranici dell'arteria carotide; spesso coinvolge l'arteria temporale e solitamente colpisce i <i>pazienti con più di 40 anni. Spesso associata a polimialgia reumatica</i>
	Arterite di Takayasu: infiammazione granulomatosa dell'aorta e dei suoi rami maggiori; solitamente colpisce <i>pazienti di età inferiore a 40 anni.</i>
Vasculiti dei vasi di medio calibro	Poliarterite nodosa: infiammazione necrotizzante delle arterie di medio e piccolo calibro <i>senza glomerulonefrite o vasculite</i> in arteriole, capillari o venule
	Malattia di Kawasaki: l'arterite coinvolge arterie di grande, medio e piccolo calibro ed è associata a <i>sindrome linfonodale mucocutanea</i> ; coinvolge spesso le coronarie, è possibile un interessamento venoso. <i>Spesso è colpita l'età infantile.</i>
Vasculiti dei vasi di piccolo calibro	Granulomatosi di Wegener: l'infiammazione granulomatosa colpisce l'apparato respiratorio e la vasculite necrotizzante colpisce i vasi di medio e piccolo calibro, la glomerulonefrite necrotizzante è comunemente presente.
	Sindrome di Churg-Strauss: infiammazione granulomatosa a spiccata componente eosinofila dell'apparato respiratorio. La vasculite necrotizzante colpisce i vasi di piccolo-medio calibro. <u>Associata ad asma ed eosinofilia plasmatica.</u>
	Poliangioite microscopica: vasculite necrotizzante pauci-immune . E' possibile anche il coinvolgimento delle arterie di piccolo-medio calibro. E' comune la glomerulonefrite necrotizzante e la capillarite polmonare è frequente.
	Porpora di Schönlein-Henoch: vasculite a depositi di IgA . Colpisce capillari, venule e arteriole per lo più cutanei, intestinali, glomerulari. <u>Associata ad artralgie o artrite.</u>
	Vasculite crioglobulinemica essenziale: vasculite associata a deposizione di crioglobuline quindi a crioglobulinemia. Frequente coinvolgimento cutaneo e glomerulare.
	Angioite cutanea leucocitoclastica: vasculite leucocitoclastica cutanea isolata, senza vasculite sistemica o glomerulonefrite.

(22)

3.19 Sindromi overlap reumatiche autoimmuni

Connettivite mista:

descritta per la prima volta da Sharp nel 1972 è una manifestazione caratterizzata da sintomi propri del LES della sclerodermia, della polimiosite/ dermatomiosite e dell'artide reumatoide, è caratterizzata dalla presenza di un anticorpo specifico l'U1snRNP, la connettivite mista è stata la prima sindrome overlap nella quale è stato incluso il riscontro ad alto titolo di uno specifico marker anticorpale.

È la più frequente sindrome overlap reumatica autoimmune, l'incidenza nelle donne è 3 volte superiore a quella degli uomini i dati sulla prevalenza sono dipendenti dai gruppi etnici presi in esame.

Gli ANA in questa patologia sono positivi ad elevato titolo 1:1280 con un pattern fluoroscopico

nucleare nucleare, la comparsa degli autoanticorpi precede l'esordio della malattia.

L'U1RNP è una delle 5 ribonucleoproteine (U1,U2,U4,U5,U6) definite snRNP (small nuclearRNP) implicate nello splicing dell'mRNA.

Gli anti U1RNP vengono ricercati con procedure analitiche basate su varie tecnologie, ELISA, Wester Blot, chemiluminescenza, non è stato riconosciuto ancora un ruolo patogenetico, possono riscontrarsi anche in pazienti con altre patologie autoimmuni nella connettivite mista la determinazione degli autoanticorpi gioca un ruolo non solo nella diagnosi ma anche nel follow-up . Infatti in uno studio in cui sono stati inclusi 161 pazienti affetti da connettivite mista hanno osservato la presenza anche di altri anticorpi e l'evoluzione della connettivite mista in un'altra connettivite , come il LES, la sclerodermia , artrite reumatoide, e connettivite indifferenziata .

Sindrome da antisintetasi:

è una sindrome caratterizzata da manifestazione della polimiosite/ dermatomiosite della sclerodermia e dell'artrite reumatoide con anticorpi per gli anti tRNA sintetasi.

Gli anticorpi anti Jo-1 hanno un pattern fluoroscopico citoplasmatico granulare.

Vengono rinvenuti nel 20-30% dei pazienti con dermatomiosite e nel 89% dei pazienti con Jo-1 positivi si osserva la prevalenza di un coinvolgimento polmonare.

Sono spesso associati agli anti-Ro/SSa e anti -La/Ssb.

Sclerosi sistemica /polimiosite (scleromiosite):

è una sindrome overlap di manifestazioni cliniche della sclerodermia e della polimiosite/dermatomiosite.

La presenza di autoanticorpi anti-PM/Slc si associa ad una prognosi favorevole .

Gli anti -Ro/SSa erano più rappresentati in pazienti con sindrome overlap sclerodermia/sindrome di Sjogren,

Gli anti Ku sono presenti nei pazienti con polimiosite/ sclerodermia.

Il LES / Sindrome di Sjogren:

Il LES è strettamente associato alla sindrome di Sjogren con coinvolgimento delle ghiandole salivari e lacrimali , a cui si manifestano i sintomi tipici del LES, fenomeno di Raynaud rash cutaneo , leucopenia, e trombocitopenia, caratteristica è la porpora ipergammaglobulinemica che si manifesta nel 33% dei pazienti.

Il marker sierologico è l'anti La/Ssb e l'anti Ro/SSa mentre gli altri anticorpi caratteristici del LES sono meno frequenti.

Alcuni studiosi ritengono che questi distinti profili autoanticorpali aiuteranno a definire la prognosi . (23)

Capitolo 4

Il Laboratorio nelle malattie Autoimmuni Sistemiche:

4.1 Gli ANA :

Sono un grosso gruppo di autoanticorpi diretti contro gli antigeni *self* nucleari non organo specifiche appartengono a tutte le classi delle immunoglobuline ma sono più comuni il tipo IgG contro molecole presenti nel nucleo (membrana, nuocleoplasma, nucleolo), hanno un elevato grado diagnostico e possono svolgere un ruolo patogenetico, sono presenti in numerose malattie autoimmuni.

Gli anticorpi contro gli antigeni nucleari sono diretti contro vari componenti nucleari della cellula, e comprendono acidi nucleici, le proteine del nucleo e le ribonucleoproteine.

La prevalenza degli anticorpi anti nucleo nelle malattie autoimmuni reumatiche è compresa tra il 20-100%.dove la frequenza più bassa si trova nell'artrite reumatoide che è tra il 20-40%.

di conseguenza, la diagnostica differenziale degli ANA è indispensabile nell'individuazione delle singole malattie reumatiche e per differenziale rispetto alle altre malattie autoimmuni.

Gli ANA hanno un importante ruolo prognostico e diagnostico, al punto che possono essere presenti molto prima dei sintomi clinici della malattia, sono presenti anche in altre patologie autoimmuni come la MCTD, la SSc e la SS, ma alcuni sottotipi sono specifici di determinate patologie.

Gli ANA a basso titolo possono essere presenti anche in soggetti sani, questo determina l'importanza dell'appropriatezza della richiesta di indagine sul paziente da parte del clinico, il quale deve applicare il percorso diagnostico appropriato, questo per poter ampliare la loro efficienza di test in termini di specificità e sensibilità, nel 2002 il gruppo di studio in Autoimmunologia della società italiana di medicina di Laboratorio ha pubblicato la propria proposta di raccomandazioni che comprendono livelli decisionali, in base al quadro fluoroscopico ottenuto, tali da poter procedere ad ulteriori test. I metodi di dosaggio degli ANA comprendono diverse metodiche tra cui quella più utilizzata è la IFI.

Principali autoantigeni

Acidi nucleici

dsDNA, U1RNA, tRNA

Proteine associate al DNA

Istoni (H1,H2A,H2B,H3,H4)

Ku (p 70-P80)

PCNA

Proteine centromeriche

DNA topoisomerasi I funzione enzimatica (Scl 70)

Proteine associate all'RNA :

Proteine spliceosomiali (U1RNP, Sm,U2RNP, hnRNP,

Proteine nucleolari (U3 snoRNP/ fibrillarina, Th/t0, PB, RNP ribosomiali, tRNA sintetasi con funzione enzimatica enzimatica, sintesi tRNA istidina,treonina,alanina,(jo-1, PL-7,PL 12).

Anticorpi anti antigeni nucleari

anticorpi anti cromatina

anti ds DNA, anti ssDNA

anti nucleosoma,

anti istoni

anticorpi anti nucleoplasma

anti DNA topoisomerasi I o Scl 70

anticorpi anti centromero (ACA) anti CEMPA, CEMPB, CEMPC

anticorpi anti RNA polimerasi R(NAP) I,II,III

anticorpi anti PCNA

anticorpi anti antigene Ku

anticorpi anti antigene Ro/SSA La/Ssb

antiantigeni del nucleolo:

anticorpi anti PM/scl

anticorpi anti Th/To

anti RNAP I,III

anticorpi anti fibrillarina.

Anticorpi anti spliceosoma

anti -RNP anti Sm

ANTICORPI ANTI ANTIGENI

CITOPLASMATICI:

anti Jo 1, e altre antisintetasi,

anti-proteine ribosomiali:

anticorpi anti-P

anticorpi anti apparato del Golgi

AGA

anticorpi anti lisosomi e endosomi.

Anti EEA1, anti CLIP -170 e gli anti GRASP1,
Anti -SRP.

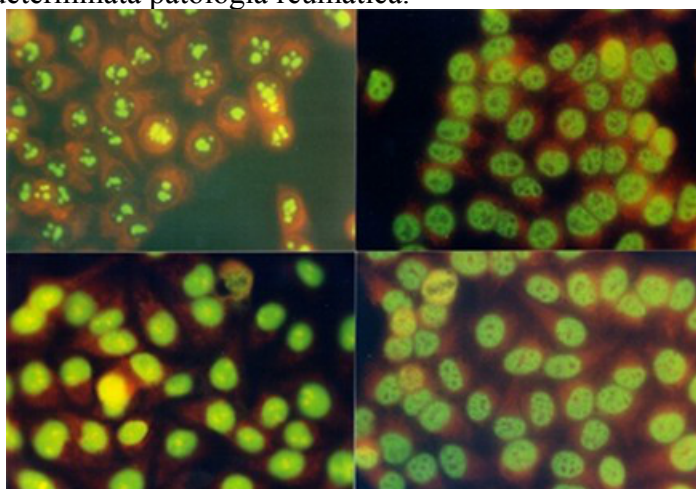
ANTICORPI ANTI APPARATO MITOTICO:

NUMa, MSA-1, MSA 2, anticorpi anti centriolo,
anticorpi anti Tubulina.

La ricerca degli ANA trova il suo significato clinico nella fase di screening diagnostico, e di monitoraggio per definire un follow-up del decorso e/o della malattia, con variazioni significative del titolo della positività.

La ricerca degli ANA deve essere motivata da un sospetto clinico o da un fattore di rischio per MAIS: possibilmente la sua richiesta dovrebbe essere corredata da una scheda clinico-anamnestica per indirizzare eventuali test di approfondimento ed ottenere una razionalizzazione del percorso diagnostico.

La ricerca di ANA ha significato perché, se effettuata con la tecnica analitica adeguata, quale l'immunofluorescenza indiretta, consente, in base al titolo e al quadro fluoroscopico individuato, l'indirizzo verso una determinata patologia reumatica.



Le immagini fluoroscopiche riguardano cellule epiteliali umane HEp-2, utilizzate per la ricerca di ANA: in base alla immunofluorescenza di colore verde brillante identificata si definisce l'aspetto fluoroscopico. Tutte e quattro le immagini sono ANA positive, l'immagine in alto a sinistra esemplifica una positività nucleolare, quella a destra una positività speckled, cioè punteggiata, in basso a sinistra è ripresa una positività omogenea, in basso a destra una positività a granulia diffusa. La diversa positività consente l'identificazione dell'autoantigene coinvolto e l'orientamento del clinico verso una definita forma clinica, come schematizzato nelle tabelle seguenti

Malattia	Test	Anticorpo	Sensibilità	Specificità
Tutte le Malattie	ANA screening		80-100%	Bassa
LES	ANA screening ENA aCL	dsDNA Sm U1RNP SSA/Ro SSB/La	90-95% 50-70% 8-20% 30% 30-50% 20% 30-50%	Bassa 90-98% 99% Bassa Bassa Bassa Bassa
Sclerodermia	ANA Screening	Scl 70 centromero	85-90% 15-20% 40-60%	Bassa 99% intermedia
Polimiosite	ANA screening ENA	Jo-1	40-60% 25%	Bassa 98%
MTCD	ANA screening ENA	U1 RNP,	100% 95-100%	Bassa 98%
Sjogreen	ANA screening ENA	SSA/Ro SSB/La RF	75% 40-80% 40-50% 70-80%	Bassa Bassa Intermedia Bassa

Questi dati indicano che il test ANA è meglio utilizzato come test di screening per le malattie autoimmuni mentre gli altri test hanno maggior significato ed efficacia se impiegati come test di secondo livello.

QUADRI FLUOROSCOPICI E PATOLOGIE ASSOCIATE

Quadri Nucleari Classici

Quadri fluoroscopici	Patologia	Antigeni associati
Omogeneo	LES	Ss/ds DNA/ Istoni
Punteggiato fine	S.Sjogreen	SSa/SSb
Granulare	MCTD	Sm/U1-RNP
Centromerico	CREST, Sclerodermia, Raynaud	CEMP-B
Nucleolare	SS,SSP	Fibrillarina, T0/Th RNA pol I
Granulia diffusa	Sclerodermia diffusa	Scl-70

Quadri Nucleari Rari

Nuclear Dot multipli	CBP	Sp 100
Rari nuclear Dot	S.Sjogreen	P80 Coilina
Lamina nucleare	CBP,LES	Laminina A,B,C
PCNA	LES	Ciclina

Quadri Citoplasmatici

Ribosomiale	LES	Proteina P Ribosomiale
Punteggiato fine	Polimiosite	jo-1 PL-7 PL-12
Mitocondriale	CBP	AMA, M2
Citoscheletro actina	EP Autoimmune	F-Actina
Citoscheletro vimentina	Artride Reumatoide	Vimentina

4.2 GLI ANCA :

Sono Anticorpi che reagiscono con gli antigeni citoplasmatici dei neutrofili, che sono MPO e PR3 due enzimi presenti nei granuli azzurrofilici α -granuli

Si identificano con pattern di fluorescenza su granulociti umani fissati in etanolo, i pattern possono essere sia citoplasmatici C-ANCA che perinucleari P-ANCA

I C-ANCA sono rivolti verso la proteinasi 3, mentre il pattern P-ANCA, verso la mieloperossidasi, sono presenti in soggetti con vasculiti sistemiche, sono presenti anche in altre patologie, come quelle neoplastiche, infettive ma sono anticorpi con specificità diverse rispetto agli MPO, e PR3.

Gli ANCA generalmente sono associati alle vasculiti.

La PR-3 è una serina proteasi, che viene inibita dalla α_1 antitripsina, è un enzima che serve per degradare il collagene ed altre strutture del connettivo

La MPO svolge delle importanti funzioni battericide, è un enzima che all'interno dei neutrofili e dei monociti determina la formazione di sostanze tossiche come H_2O_2 e HOCL e radicali dell'ossigeno per la distruzione dei batteri.

Sono stati identificati anche altri ANCA contro la lattoferrina, elastasi, catepsina G, ma le non sono ancora utilizzati come target patologici.

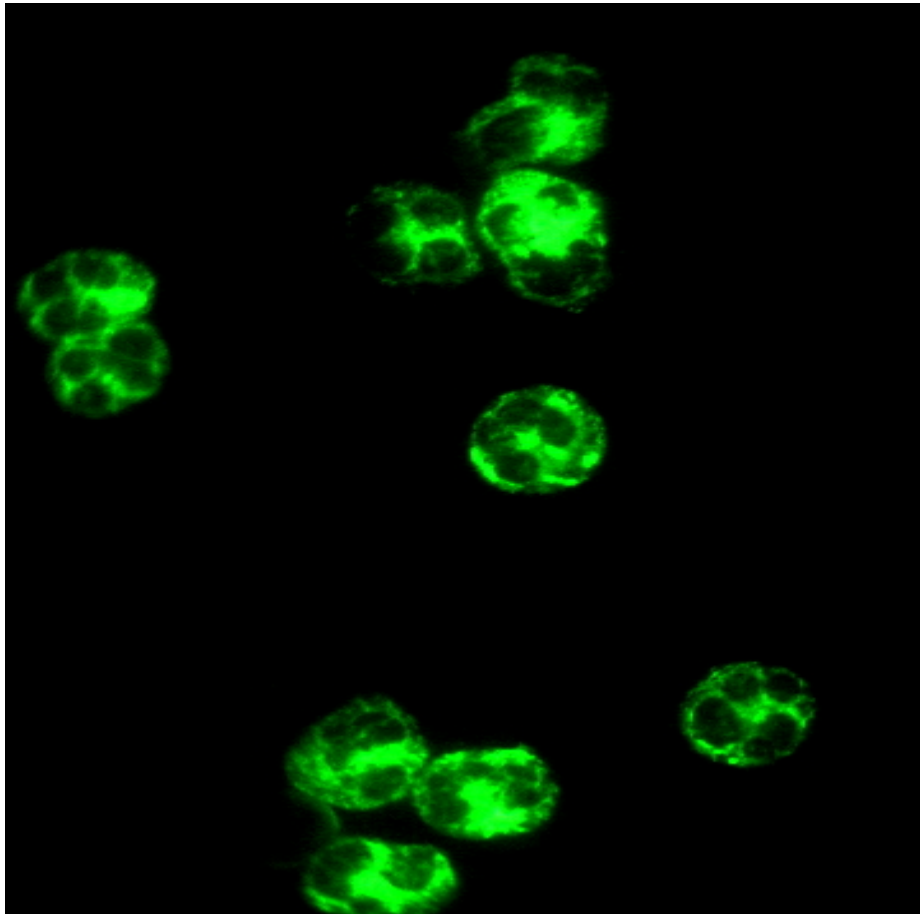
Gli ANCA svolgono un ruolo patogenetico, in soggetti affetti da vasculiti l'antigeni PR3 ed MPO si legano sulla membrana delle cellule endoteliali determinando un processo di danno endoteliale mediato da anticorpi, inoltre facilitano il processo di adesione dei neutrofili con le cellule endoteliali.

Gli ANCA sono presenti anche in soggetti con altre patologie come nel 50-70% di soggetti con Rettocolite Ulcerosa, e sono utili per la diagnosi differenziali con il morbo Crohn.

I sieri ANCA positivi da pazienti affetti da vasculiti sistemiche primitive producono all'IFI due patterns caratteristici: - C-ANCA: colorazione citoplasmatica granulare diffusa, spesso con accentuazione dell'intensità della fluorescenza tra i lobi nucleari. Questo pattern è associato nel 90-95% dei casi alla presenza di autoanticorpi specifici per la PR3. - P-ANCA: colorazione perinucleare e/o nucleare, causata nell'80% circa dei casi dalla presenza di MPO-ANCA (include i cosiddetti GS-ANA). Nella maggior parte dei pazienti affetti da GW in forma attiva e generalizzata si riscontrano C-ANCA con specificità per la PR3, in circa il 20-30% si trovano invece P-ANCA con specificità per la MPO. Circa il 70-80% dei pazienti affetti da poliangioite microscopica o glomerulonefrite extracapillare necrotizzante auto-immune presenta P-ANCA specifici per la MPO mentre il 30% ha C-ANCA specifici per la PR3. Occasionalmente sono stati descritti quadri C-ANCA/MPO-ANCA e P-ANCA/PR3-ANCA^{11,12}. ANCA (sia C che P) sono presenti anche nel 40-60% dei pazienti affetti da sindrome di Churg Strauss. P-ANCA o patterns fluoroscopici atipici sono descritti, con diversa prevalenza, in pazienti affetti da malattie intestinali infiammatorie croniche, epatopatie e malattie reumatologiche^{8,9}. Sono causati da anticorpi diretti contro antigeni (lattoferrina, elastasi, bactericidal/permeability increasing protein, betaglicuronidasi, catepsina G, azurocidina, lisozima, high mobility group proteins, alfa-enolasi, actina, catalasi e altri non ancora identificati) diversi da quelli generalmente associati alle vasculiti (PR3 e MPO), il cui ruolo patogenetico e/o significato clinico sono ignoti. P-ANCA e ANCA atipici possono essere rilevati in

corso di alcune vasculiti iatrogeniche. Deve essere ribadito che il solo riscontro di positività ANCA, in assenza di dati clinici indicativi, non può essere considerato diagnostico e motivare l'inizio di un trattamento terapeutico.

(24)



CAPITOLO 5

5.1 TECNICHE A CONFRONTO:

Nell'Asl 12 di Viareggio, gli esami che riguardano l'autoimmunità si effettuano nel settore della sierologia, che si avvale di due tecniche: l'Elia, e l'Immunofluorescenza indiretta, completamente automatizzata la prima, semi-automatizzata la seconda.

Per ottenere un miglioramento della qualità delle prestazioni è necessaria l'appropriatezza nella richiesta e della scelta dei test autoanticorpali, per la diagnosi e il controllo delle malattie autoimmuni, questo purtroppo non sempre avviene, a volte i test di laboratorio vengono utilizzati non per confermare una diagnosi ma per escluderla, quando ci troviamo di fronte ad una richiesta non appropriata comporta un inevitabile ed inutile spreco.

È di fondamentale importanza l'inquadramento clinico di una malattia autoimmune questo perché

non tenendo conto della prevalenza della malattia, delle caratteristiche dei test molto sensibili e specifici, e dei valori predittivi positivi e negativi si rischia di sottoporre pazienti ad ulteriori test inutilmente, è per questo che è importantissima la scelta del campione dei pazienti in esame.

Sensibilità e specificità diagnostica dei test autoanticorpali, in rapporto alle diverse malattie autoimmuni.

5.2 SCOPO DELLA TESI

Si vuole dimostrare che le tecniche ELIA anche se in continua evoluzione non possono sostituire ancora le tecniche IF, e quindi restano comunque complementari allo scopo di diagnosi e followup delle malattie autoimmuni sistemiche

5.3 MATERIALI E METODI:

Nel Laboratorio di Analisi dell'Ospedale Unico della Versilia utilizziamo due tecniche per la determinazione degli autoanticorpi

L'esame ELIA è un immunodosaggio d'enzima fluorescente (fluorescent enzyme immunoassay, FEIA) ed è progettato sotto forma di immunodosaggio "sandwich".

Un well viene rivestito con un antigene specificamente riconosciuto dagli anticorpi bersaglio, che rappresentano i marcatori per una determinata malattia autoimmune. Se questi specifici anticorpi sono presenti nel campione ematico del paziente, si legheranno all'antigene. Nella successiva fase di reazione, un anticorpo secondario coniugato all'enzima si lega all'anticorpo bersaglio, legato all'antigene.

L'enzima trasforma un substrato aggiunto in un prodotto fluorescente. Confrontando il segnale della fluorescenza con quello di calibratori di concentrazioni note, può essere determinata la concentrazione anticorpale nel campione dell'esame.

Per la tecnica ELIA utilizziamo lo strumento Phadia 2500 Immunocap

Phadia 2500 è adatto a laboratori con una domanda di esami molto elevata. Con Phadia 2500 è un dosaggio multiplex, con un primo test generale, ENA screen e se positivo, eseguirà poi nello specifico i diversi ENA.

IMMUNOCAP 2500

Tecnologia IMMUNOCAP:

La fase solida di immunoCAP ha la capacità di estrarre molecole dell'analita dal campione in quanto dispone di una struttura tridimensionale coperta da una grande quantità di antigeni.

Questi antigeni sono legati covalentemente alla fase solida e reagiscono con la molecola interessata nel campione del paziente

La molecola che amplifica la reazione si lega al complesso usando un anticorpo anti analita e di trasporto un enzima capace di effettuare una reazione enzimatica, il substrato utilizzato non è fluorescente ma durante la reazione enzimatica viene convertito in un prodotto fluorescente, la fluorescenza è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita

IMMUNOCAP IgG specifica

Misura la concentrazione delle IgG specifiche nel plasma o nel siero

Prodotti utilizzati nel laboratorio di Analisi dell'Ospedale Versilia

Product Size Art. No. Connective Tissue Diseases EliA CTD Screen Well

EliA Symphony Well , EliA dsDNA Well EliA ssDNA Well EliA, U1RNP Well EliA RNP70 Well
EliA SmDP Well , EliA Ro Well , EliA Ro52 Well , EliA Ro60 Well 4, EliA La Well , EliA CENP
Well ,EliA Scl-70S Well ,EliA RNA Pol III Well , EliA Jo-1 Well EliA Fibrillarin Well , EliA Rib-P
Well , EliA PM-Scl Well ,EliA PCNA Well , EliA Mi-2 Well 2 x 12 14-5604-01 Rheumatoid
Arthritis EliA CCP Well EliA CCP IgA Well EliA RF IgM Well ,EliA RF IgA Well ,EliA RF IgG
Well Anti-Phospholipid Syndrome EliA Cardiolipin IgG Well, EliA Cardiolipin IgM Well , EliA
Cardiolipin IgA Well , EliA β 2-Glycoprotein I IgG Well , EliA β 2-Glycoprotein I IgM Well 4 x 12
14-5533-01 EliA β 2-Glycoprotein I IgA Well Vasculitis and Goodpasture Syndrome EliA PR3S
Well EliA MPOS Well EliA GBM Well

IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA : AP IF 16 PLUS EUROIMMUN.

Il test serve per la determinazione in vitro di anticorpi nei capioni dei pazienti, può essere eseguita in modo qualitativo o quantitativo.

Le cellule Hep-2 vengono incubata con il campione diluito in un paziente.

Se la reazione è positiva specifici anticorpi IgG,IgM,IgA si legano agli antigenici.

In un secondo passaggio gli anticorpi che si sono legati reagiscono con anticorpi anti-immunoglobuline umane coniugati con fluorescina e vengono evidenziati con microscopio a fluorescenza.

Descrizione	Formato	Simbolo
Vetrini ciascuno contenente 5 BIOCHIP coattati con cellule Hep-2	10 Vetrini	SLIDE
Anticorpi anti IgG umane coniugati con fluorescina	1*1,5 ml	CONJUGATE
Controllo Positivo	1*0,25 ml	POS CONTROL
Controllo Negativo	1*0.1 ml	NEG CONTROL
Confezione di sale per tampone fosfato. Tween20	2	PBS TWEEN 20

Mezzo di montaggio Vetrini coprioggetto Scheda Tecnica	2*2 ml 12 1	GLYCEROL COVERGLASS
--	-------------------	------------------------

I Vetrini ed i reagenti devono essere conservati ad una temperatura +2 e +8 dall data di produzione il kit è stabile per un periodo di 18 mesi se conservato correttamente

Esecuzione del test

la tecnica Titerplane :

depositare 30 microlitri di siero diluito ad ogni pozzetto per la valutazione qualitativa diluire il campione 1:100, r 30 minuti a temperatura ambiente

lavare i vetrini direttamente in un beker contenente il tampone PBS Tween, immergerli per almeno 5 minuti

Aggiungere 25 microlitri di anticorpi anti Ig umane coniugati con fluorescina incubare per 30 minuti a temperatura ambiente

lavare nuovamente per 5 minuti

Montaggio con 10 microlitri di glicerina tamponata

Osservare al microscopio a 40 X (substrati cellulari)

L'interpretazione dei risultati :

Valutazione qualitativa

Reattività per ANA	Valutazione del risultato
Nessuna reazione a 1:100	Negativo
Reazione Positiva 1:100	Tracce possibile indicazione di MA
Reazione Positiva 1:320	Positivo : indicazione di diverse MA

Valutazione quantitativa:

il titolo anticorpale è definito come il fattore di diluizione più basso con il quale è possibile

evidenziare fluorescenza.

Questo deve essere confrontato con la reazione che si ottiene utilizzando un siero negativo diluito con lo stesso fattore di diluizione.

Titoli Anticorpali

1:10	1:100	1:1000	1:10000	Titolo Anticorpale
Debole	Negativa	Negativa	Negativa	1:10
Moderata	Negativa	Negativa	Negativa	1:32
Intensa	Debole	Negativa	Negativa	1:100
Intensa	Moderata	Negativa	Negativa	1:320
Intensa	Intensa	Debole	Negativa	1:1000
Intensa	Intensa	Moderata	Negativa	1:3200
Intensa	Intensa	Intensa	Debole	1:10000.

Alcuni tra i più importanti pattern di fluorescenza sono la fluorescenza omogenea e granulare del nucleo e la fluorescenza dei nucleoli e dei centromeri identificabili soprattutto nelle cellule in fase mitotica, molto spesso il pattern di fluorescenza è correlato con la struttura antigenica bersaglio nucleare o citoplasmatica.

Nel Laboratorio Analisi Versilia il montaggio dei vetrini avviene in maniera automatizzata con lo strumento AP16 , esso in grado di eseguire tutti i protocolli IFI dalla prediluizione alla dispensazione dei campioni e dei reagenti e il lavaggio dei vetrini., con alcuni vantaggi come l'eliminazione della variabilità analitica legata alla preparazione manuale dei campioni.

Caratteristiche del Test:

Antigene:

Si utilizzano come substrato le cellule Hep-2 che presentano un largo spettro di antigeni nucleari umani , utilizzando il fegato di primate come substrato antigenico è possibile differenziare ulteriormente lo spettro anticorpale del campione.

Con la positività del test è possibile poi eseguire la ricerca di antigeni specifici con tecniche come l'ELISA o nel nostro laboratorio ELIA..

Il vantaggio della tecnica IFI è che poco costosa, una alta specificità e sensibilità ma con interpretazione dei risultati soggettiva.

Il contenimento della spesa sanitaria è una necessità , l'OMS da anni prospetta per il futuro uno scenario di costi crescenti a fronte di risorse limitate, tutti i sistemi anche quelli basati su un modello di sanità privata hanno questa necessità, e quindi migliorare l'appropriatezza delle richieste di laboratorio può migliorare l'impiego delle risorse .

La medicina basata sulle evidenze EBM, si prefigge lo scopo di valutare criticamente i risultati

reperibili nella letteratura scientifica disponibile e ricavarne indirizzi di pratica clinica, assegnando a ciascuno di essi un livello di evidenza , più o meno accentuato.

È alla base anche della appropriatezza nella richiesta di diagnostica di laboratorio.

Le linee guida per quanto riguardano le raccomandazioni sul comportamento più appropriato di condurre il procedimento diagnostico allo scopo di migliorare l'efficienza e l'efficacia della diagnosi e monitoraggio della malattia .

5.4 RISULTATI:

ANA	PATTERN	nDNA	ENA	ANCA
1:160	Omo/cito	N	N	
1:2500	Speckled		Ssa > 240 SSb 209	
1:1280	Granulare		Ssa > 240 SSb > 240	
1:640	Speckled		Ssa > 240 SSb > 240	
1:128	Numa 1			
1:640	Diffuse grainy	17		
1:160	Nucleolare			
1:1280	Fine		SSa > 240 SSb 17	
1:80	Omogeneo	N	N	N

1:40	Nucleolare	N	N	
1:640	Omogeneo	17.7	N	6.7
1. 1:320	Speckled	N	SSa> 240 SSb 37	
1:2500	Centrometro		ACA 132	
N	N	N	N	N
1:320	Omogeneo	N	SSa>240	
1:1280	Omogeneo	N	N	
1:5000	Centromero		SSa20 ACA> 320	
N		N	SSa>240	
1:80	Granulare	N	N	N
1:10000	Granulare		Ssa > 240	
1:320	Omogeneo	N	N	N
1:1280	Omogeneo	420	N	
1:320	Omogeneo	39		
1:10000	Nucleare		Ssa > 240	

5.4 CONCLUSIONI

Questa tabella rappresenta un campione di 25 pazienti dei tantissimi che affluiscono all'Ospedale Unico della Versilia, i pattern e i titoli come si può osservare possono essere diversi anche se associati allo stesso tipo di autoanticorpo, tutta via nel laboratorio di Sierologia le richieste giungono solitamente come ;ANA e ENA screenig, c'è comunque da considerare anche se al paziente è già stata diagnosticata una patologia autoimmune e si reca per valutare nel tempo il titolo

Se si tratta invece di un paziente in cui c'è il sospetto forte della presenza di una patologia autoimmune si procede con test a cascata, a parte gli esami ematochimici generali, gli ANA rappresentano il primo livello di esami di screenig, che in base alla valutazione dei risultati si procederà poi a test di secondo livello più specifici per diagnosticare la patologia, e ovviamente il clinico dovrà comunque considerare se gli aspetti sintomatologici siano

congruenti con i risultati del referto.

In base alle considerazioni le due metodiche prese in esame non sono intercambiabili considerando che le tecniche come l'ELIA siano molto sensibili possono aumentare i falsi positivi, generando preoccupazioni inutili, allora è importante modulare la potenza di questi nuovi test rispetto alla metodiche più “antiche” organizzando un algoritmo diagnostico che possa utilizzarli come test di secondo livello, posso concludere che le metodiche prese in considerazione sono Complementari e si prestano perfettamente alla esigenza di procedere con esami di primo livello ed esami di secondo livello se necessario.

BIBLIOGRAFIA

- 1 I.Roitt J.Brostoff D.Male Immunologia Zanichelli
- 2 R.Tozzoli N. Bizzaro “ la diagnostica di laboratorio nelle malattie Autoimmuni
- 3R.Tozzoli N.Bizzaro D.Villalta R.Tonutti “ Il laboratorio nelle malattie reumatiche Autoimmuni
- 4 I.Roitt J.Brostoff D.Male Immunologia Zanichelli
- 5 Fehérvári Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:203-208.
- 6 Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345-352.
- 7 Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450:566-569.
- 8 Sakakugi 2000Regulatory T Cells: Key Controllers of Immunologic Self-Tolerance**
- 9van Lith, Marcel, and Adam M. Benham. "The DMA and DMβ chain cooperate in the oxidation and folding of HLA-DM." *The Journal of Immunology* 177.8 (2006): 5430-5439.
- 10 Vignali, Dario AA, Lauren W. Collison, and Creg J. Workman. "How regulatory T cells work." *Nature Reviews Immunology* 8.7 (2008): 523-532.
- 11 Ochs, Hans D., Steven F. Ziegler, and Troy R. Torgerson. "FOXP3 acts as a rheostat of the immune response." *Immunological reviews* 203.1 (2005): 156-164.
- 12 Garín, Marina I., et al. "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+ CD25+ T cells." *Blood* 109.5 (2007): 2058-2065.
- 13 Read, Simon, Vivianne Malmström, and Fiona Powrie. "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+ CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation." *The Journal of experimental medicine* 192.2 (2000): 295-302.
- 14 Ochs, Hans D., Steven F. Ziegler, and Troy R. Torgerson. "FOXP3 acts as a rheostat of the immune response." *Immunological reviews* 203.1 (2005): 156-164.
- 15 Vignali, Dario AA, Lauren W. Collison, and Creg J. Workman. "How regulatory T cells work." *Nature Reviews Immunology* 8.7 (2008): 523-532.
- 16 Li, Hui, et al. "CD4+ CD25+ regulatory T cells decreased the antitumor activity of cytokine-induced killer (CIK) cells of lung cancer patients." *Journal of Clinical Immunology* 27.3 (2007): 317-326.
- 17 Tang, Qizhi, and Jeffrey A. Bluestone. "The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation." *Nature immunology* 9.3 (2008): 239-244.

18 Bettelli, Estelle, Mohamed Oukka, and Vijay K. Kuchroo. "TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity." *Nature immunology* 8.4 (2007): 345-350.

19 I.Roitt J.Brostoff D.Male Immunologia Zanichelli

20 Ruolo dei linfociti T CD 4 CD 25 Foxp3 P.onorato

21 Pauley, Kaleb M., Seunghee Cha, and Edward KL Chan. "MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases." *Journal of autoimmunity* 32.3 (2009): 189-194.

22 Cinquanta, Luigi, and Renato Tozzoli. "Gli autoanticorpi nelle sindromi overlap reumatiche autoimmuni." *La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio-Italian Journal of Laboratory Medicine* 10.1 (2014): 6-14.

23 R.Tozzoli N. Bizzaro “ la diagnostica di laboratorio nelle malattie Autoimmuni.

Cap 1 - INTRODUZIONE

- **1.1 Criteri minori di diagnosi**
- **1.2 Classificazione delle malattie autoimmuni**

Cap 2 - ETIOPATOGENESI DELLE MALATTIE AUTOIMMUNI

- **2.1 Fattori Neuroendocrini**
- **2.2 Fattori Ambientali**
- **2.3 Fattori genetici**
- **2.4 Tolleranza immunologica**
 - 2.4.1 Cenni storici
 - 2.4.2 Induzione sperimentale alla Tolleranza
 - 2.4.3 Tolleranza Centrale linfociti T
 - 2.4.4 Tolleranza Periferica linfociti T
 - 2.4.5 Apoptosi come meccanismo di controllo per le cellule autoreattive
 - 2.4.6 Molecole Co stimolatorie
 - 2.4.7 Linfociti T Regolatori
 - 2.4.8 Tolleranza B dipendente
 - 2.4.9 Tolleranza B periferica
- **2.5 Linfociti T-reg e Autoimmunità**
- **2.6 Ruolo dei miRNA nelle malattie autoimmuni**

Cap 3 - LE CONNETTIVITI: ASPETTI ETIOPATOGENETICI E DIAGNOSTICI

- **3.1 Lupus eritematoso sistemico**
 - 3.1.2 Etiopatogenesi
 - 3.1.3 Epidemiologia
 - 3.1.4 Quadro clinico e diagnosi
- **3.2 Artrite Reumatoide**
 - 3.2.1 Etiopatogenesi
 - 3.2.2 Epidemiologia
 - 3.2.3 Quadro clinico e diagnosi
- **3.3 Sindrome di Sjogren**
 - 3.3.1 Etiopatogenesi
 - 3.3.2 Epidemiologia
 - 3.3.3 Quadro clinico e Diagnosi
- **3.4 Sclerosi sistemica progressiva**
 - 3.4.1 Etiopatogenesi
 - 3.4.2 Epidemiologia
- **3.5 Polidermatomiosite**
 - 3.5.1 Etiopatogenesi
 - 3.5.2 Epidemiologia
 - 3.5.3 Quadro clinico e diagnosi
- **3.6 Sindrome da anti-fosfolipidi**
- **3.7 Vasculiti**
- **3.8 Sindromi Overlap**

Cap 4 - IL RUOLO DEGLI AUTOANTICORPI

- 4.1 Anticorpi ANA
- 4.2 Anticorpi ANCA

Cap 5 - IL LABORATORIO - CONSIDERAZIONI METODOLOGICHE

- 5.1 Tecniche diagnostiche a confronto
- 5.2 Scopo della Tesi
- 5.3 Materiali e metodi
- 5.4 Risultati
- 5.4 Conclusioni

A mia Figlia Sara e Andrea.